

MEDYCYNA DOŚWIADCZALNA I MIKROBIOLOGIA

ORGAN NARODOWEGO INSTYTUTU ZDROWIA PUBLICZNEGO
- PAŃSTWOWEGO ZAKŁADU HIGIENY

1

ROK LXX KWARTALNIK 2018
NARODOWY INSTYTUT ZDROWIA PUBLICZNEGO -
- PAŃSTWOWY ZAKŁAD HIGIENY

MEDYCYNĄ DOŚWIADCZALNĄ I MIKROBIOLOGIĄ
Organ Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego
– Państwowego Zakładu Higieny i Polskiego Towarzystwa
Mikrobiologów

REDAKCJA

Redaktor: WALDEMAR RASTAWICKI
Zastępca Redaktora: RAFAŁ GIERCZYŃSKI
Sekretarz: KATARZYNA ZACHARCZUK
Redaktor językowy (język polski): STANISŁAW KAŁUŻEWSKI
Redaktor językowy (język angielski): MARIA DOMINGUEZ
Redaktor statystyczny: DANIEL RABCZENKO

KOMITET REDAKCYJNY

D. Dzierżanowska - Warszawa, S. Giedrys-Kalemba - Szczecin, E. Gołąb - Warszawa,
E. Gospodarek - Bydgoszcz, P.B. Heczko - Kraków, A. Jaworski - Łódź,
B. Litwińska - Warszawa, K. Piekarska - Warszawa, B. Różalska - Łódź,
A. Stankiewicz - Warszawa, E.M. Szewczyk - Łódź, A. Szkaradkiewicz - Poznań,
J. Szych - Warszawa, E.A. Trafny - Warszawa, S. Tyski - Warszawa,
M.L. Zaremba - Białystok, A.A. Zasada - Warszawa, Z. Zwolska - Warszawa

Adres Redakcji: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24

E-mail: medmikrobiol@pzh.gov.pl

Tel: 22 54 21 325; 22 54 21 240

Fax: 22 54 21 307

www.medmikro.org.pl

Indeks 365226

Punktacja za publikację wg MNiSW – 7 pkt.

Index Copernicus – 89,77 pkt.

Kwartalnik „Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia” jest indeksowany
w bazie danych pn. Polska Bibliografia Lekarska (PBL).

W latach 1949 - 2017 kwartalnik Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia ukazywał się
jako organ Państwowego Zakładu Higieny (obecnie Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego -
Państwowy Zakład Higieny) w Warszawie oraz Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów

NARODOWY INSTYTUT ZDROWIA PUBLICZNEGO -
- PAŃSTWOWY ZAKŁAD HIGIENY

Skład i druk: Agencja Reklamowa TOP, ul. Toruńska 148, 87-800 Włocławek,
tel.: 54 423 20 40, fax: 54 423 20 80, www.agencjatop.pl



Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego
- Państwowy Zakład Higieny

„100 LAT TROSKI O ZDROWIE POLAKÓW”

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny jest najstarszą instytucją zdrowia publicznego w Polsce.

W 2018 r. obchodzimy 100-lecie Naszego Instytutu, który został utworzony jako Państwowy Centralny Zakład Epidemiologiczny, w 1923 r. przemianowany na Państwowy Zakład Higieny (PZH), a od 2007 r. nosi nazwę: Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny.

Powstanie naszej instytucji było reakcją władz Odrodzonej Polski na zagrożenia zdrowotne ludności na terenach dawnych zaborów rosyjskiego i austriackiego po wybuchu Rewolucji Październikowej i kapitulacji Niemiec w I Wojnie Światowej. Zniszczenia wojenne, powojenna nędza i przemieszczanie się ze wschodu setek tysięcy repatriantów i uchodźców spowodowało występowanie epidemii licznych chorób, z których najgroźniejszymi były epidemie duru plamistego i duru brzusznego.

Historia instytucjonalnego zwalczania i zapobiegania epidemiom w Odrodzonej Polsce rozpoczęła się od powołania w sierpniu 1919 r. Centralnego Komitetu do walki z durem plamistym, a następnie w marcu 1920 r. Naczelnego Nadzwyczajnego Komisariatu do walki z epidemiami, któremu zawdzięczamy organizację kordonów sanitarnych i skuteczne zwalczenie epidemii.

Państwowy Zakład Higieny powstał jako wcześniej przygotowywane zaplecze naukowe i laboratoryjne tych działań, ale od samego początku był projektowany, według dalekosiężnej wizji Ludwika Rajchmana (pierwszego dyrektora PZH w latach 1918-1932), jako nowoczesny instytut ogarniający swą działalnością ekspercką podstawowe domeny zdrowia publicznego.

Z biegiem lat zakres działalności Instytutu był dostosowywany do zmieniających się potrzeb i wyzwań w zakresie ochrony zdrowia społeczeństwa. Działalność naukowa, usługowa i szkoleniowa obejmowała zawsze podstawowe zagrożenia i problemy zdrowia publicznego.

Początkowo zakres działalności naukowo-badawczej i usługowej Instytutu obejmował takie zagadnienia jak profilaktyka, diagnostyka i leczenie chorób zakaźnych, higiena pracy, higiena psychiczna i higiena odżywiania, badania żywności i przedmiotów użytku, inżynieria sanitarna i administracja sanitarna, jak również kontrola surowic i szczepionek oraz innych leków. Niektóre z tych dziedzin rozrosły się i wymagały powołania odrębnych placówek naukowych. W ten sposób z Państwowego Zakładu Higieny wyłoniły się: Instytut Leków, Instytut Żywności i Żywienia, Instytut Medycyny Pracy im. Prof. J. Nofera w Łodzi, Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej i Instytut Antybiotyków, a nasz Instytut podjął nowe wyzwania.

Obecnie, w Narodowym Instytucie Zdrowia Publicznego - Państwowym Zakładzie Higieny są wyodrębnione dwa piony naukowe:

Analiz i Strategii w Zdrowiu Publicznym, który zajmuje się monitorowaniem i analizą stanu zdrowia ludności, analizami ekonomicznymi i systemowymi ochrony zdrowia, promocją zdrowia i prewencją chorób przewlekłych, a także problematyką kształcenia i komunikacji w zdrowiu publicznym.

Bezpieczeństwa Epidemiologicznego i Środowiskowego, który zajmuje się nadzorem nad chorobami zakaźnymi, ich szerzeniem się oraz czynnikami ryzyka, promowaniem szczepień i bezpieczeństwem szczepionek, diagnostyką oraz różnicowaniem drobno-ustrojów chorobotwórczych, metodami unieszkodliwiania czynników zakaźnych, a także identyfikacją i oceną potencjalnie szkodliwych czynników chemicznych, fizycznych i mikrobiologicznych w żywności, wodzie, powietrzu i wybranych elementach środowiska, a także oceną ryzyka zdrowotnego.

Instytut współpracuje z wieloma ośrodkami naukowymi i instytucjami zarówno krajowymi, jak i międzynarodowymi (WHO, Komisja Europejska, ECDC).

Obchody 100-lecia Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny odbywają się pod hasłem: „100 LAT TROSKI O ZDROWIE POLAKÓW”. Zostały one objęte Patronatem Honorowym Prezydenta Rzeczypospolitej Polskiej Andrzeja Dudy.

W ramach obchodów, w dniu 9 kwietnia 2018 roku odbędzie się Jubileuszowa Gala w Filharmonii Narodowej oraz planowane jest zorganizowanie trzech konferencji naukowych:

„100 lat wśród patogenów” – czerwiec 2018 r.

Konferencja poświęcona zakażeniom wywoływanym przez różne patogeny oraz roli NIZP-PZH w ich diagnozowaniu, monitorowaniu i zwalczaniu, ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia immunoprofilaktyki. Poruszone zostanie również zagadnienie dotyczące niezbędności mikroorganizmów dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka jak również możliwości zastosowania patogenów w leczeniu chorób nowotworowych.

„Zdrowie Polaków - wczoraj, dziś i jutro” – październik 2018 r.

Konferencja poświęcona zmianom stanu zdrowia Polaków i jego uwarunkowań od okresu międzywojennego do chwili obecnej oraz przewidywanym trendom w przyszłości z uwzględnieniem zachodzących zmian demograficznych. Uwzględniona zostanie transformacja epidemiologiczna, problemy higieny, oświaty zdrowotnej i promocji zdrowia. Uwzględnione zostaną również związki między sytuacją zdrowotną a systemem ochrony zdrowia.

„Żywność, woda i powietrze – czy żyjemy w bezpiecznym otoczeniu?” – grudzień 2018 r. Konferencja będzie dotyczyła zagadnień związanych z identyfikacją zagrożeń występujących w żywności, wodzie i powietrzu wynikających z antropogenicznego stresu chemicznego w środowisku i zmian klimatycznych, a także związanej z nimi oceny ryzyka wystąpienia skutków zdrowotnych.

Gorąco zapraszamy do udziału w organizowanych konferencjach naukowych oraz lektury czasopism naukowych wydawanych przez Instytut.

*Dyrekcja Instytutu,
Komitet Naukowy i Komitet Organizacyjny Obchodów 100-lecia NIZP-PZH*

SPIS TREŚCI

PRACE ORYGINALNE

M. Równicki, K. Szymanek-Majchrzak, A. Młynarczyk, A. Sawicka-Grzelak, G. Młynarczyk. Częstość występowania fenotypu <i>MLS_B</i> oraz genów <i>ermA</i> , <i>ermC</i> u metycyliny-opornych, szczepów <i>Staphylococcus aureus</i> izolowanych w warszawskim szpitalu klinicznym w latach 2012 i 2014	7
K. Gawlik, W. Waksmańska, J. Rutkiewicz. Inwazyjna choroba pneumokokowa u mieszkańców Bielska-Białej i okolic w latach 2007-2016	17
K. Piekarska, T. Wołkowicz, N. Wolaniuk, K. Zacharczuk, M. Rzekowska, R. Gierczyński. Analiza pełnogenomowych sekwencji trzech wyisobnionych z materiału klinicznego od ludzi szczepów <i>Salmonella enterica</i> serotyp Enteritidis ST11 o obniżonej wrażliwości na ciprofloksacynę	27
M. Aptekorz, M. Kabała, B. Wiechuła, C. Harmanus, E. Kuijper, G. Martirosian. Rola parametrów stanu zapalnego w kale pacjentów z zakażeniem <i>Clostridium difficile</i> : badania wstępne	37
M. Kierzkowska, A. Majewska, K. Szymanek-Majchrzak, A. Sawicka-Grzelak, A. Młynarczyk, G. Młynarczyk. Oporność typu <i>MLS_B</i> u klinicznych izolatów <i>Bacteroides</i> i <i>Parabacteroides</i>	49
M. Pobiega, A. Chmielarczyk, M. Pomorska-Wesołowska, D. Romaniszyn, P.B. Heczko, J.Kozioł, J. Wojkowska-Mach. Charakterystyka klinicznych izolatów <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pod kątem tworzenia biofilmu, lekooporności oraz występowania genów	57
M. Przybylski, T. Dzieciatkowski, A. Żuk-Wasek, A. Waszczuk-Gajda, J. Biliński, P. Boczek, M. Wróblewska. Porównanie testów real-time PCR do ilościowego oznaczania DNA wirusa cytomegalii z użyciem systemu LightCycler 2.0 u pacjentów hematologicznych	67
J. Wróblewska, W. Chudobińska Kula, M. Ziuziakowski, J. Kasprzak. Serologiczne markery wirusowego zapalenia wątroby typu B	77

PRACE POGLĄDOWE

A.K. Kierzkowska. Właściwości i zastosowanie miedzi przeciwdrobnoustrojowej w zapobieganiu zakażeniom szpitalnym w placówkach medycznych	83
H. Stypułkowska-Misiurewicz. Wspomnienia ze 100 lat historii laboratorium bakteriologicznego w Państwowym Zakładzie Higieny. Jego pracownicy oraz rola jaką odegrali w opanowywaniu epidemii	91

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

M. Równicki, K. Szymanek-Majchrzak, A. Młynarczyk, A. Sawicka-Grzelak, G. Młynarczyk. The prevalence of the MLS _B phenotype and <i>ermA</i> , <i>ermC</i> genes in methicillin-resistant, clinical strains of <i>Staphylococcus aureus</i> isolated in Poland in 2012 and 2014	7
K. Gawlik, W. Waksmańska, J. Rutkiewicz. Invasive pneumococcal disease in the inhabitants of Bielsko-Biała and the surrounding area in the period 2007-2016	17
K. Piekarska, T. Wołkowicz, N. Wolaniuk, K. Zacharczuk, M. Rzezkowska, R. Gierczyński. Analysis of draft whole genome sequences of three clinical strains of <i>Salmonella enterica</i> serotype Enteritidis ST11 with decreased susceptibility to ciprofloxacin	27
M. Aptekorz, M. Kabała, B. Wiechuła, C. Harmanus, E. Kuijper, G. Martirosian. The Role of Inflammatory Parameters in feces of patients with <i>Clostridium difficile</i> Infections: preliminary study	37
M. Kierzkowska, A. Majewska, K. Szymanek-Majchrzak, A. Sawicka-Grzelak, A. Młynarczyk, G. Młynarczyk. MLS _B resistance in clinical isolates of <i>Bacteroides</i> and <i>Parabacteroides</i>	49
M. Pobiega, A. Chmielarczyk, M. Pomorska-Wesołowska, D. Romaniszyn, P.B. Heczko, J. Koziół, J. Wojkowska-Mach. Characteristic of clinical isolates of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> regarding biofilm formation, drug resistance and genes for toxins secreted by the type 3 secretion system	57
M. Przybylski, T. Dzieciatkowski, A. Żuk-Wasek, A. Waszczuk-Gajda, J. Biliński, P. Boczek, M. Wróblewska. Results comparison of cytomegalovirus viral load in hematological patients using real-time PCR assays designed for LightCycler 2.0 system	67
J. Wróblewska, W. Chudobińska Kula, M. Ziuziakowski, J. Kasprzak. Serological markers of hepatitis B virus	77

REVIEWS

A.K. Kierzkowska. Properties and use of antimicrobial copper in the prevention of nosocomial infections in medical facilities	83
H. Stypułkowska-Misiurewicz. Memories from 100 years of history of the bacteriological laboratory at the National Institute of Hygiene. His employees and the role they played in controlling the epidemic and protecting the health of the Polish population	91

Częstość występowania fenotypu MLS_B oraz genów *ermA*, *ermC* u metycyliny-opornych, szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych w warszawskim szpitalu klinicznym w latach 2012 i 2014

The prevalence of the MLS_B phenotype and *ermA*, *ermC* genes in methicillin-resistant, clinical strains of *Staphylococcus aureus* isolated in Poland in 2012 and 2014

Marcin Równicki^{1,2}, Ksenia Szymanek-Majchrzak¹, Andrzej Młynarczyk¹, Anna Sawicka-Grzelak¹, Grażyna Młynarczyk¹

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, Warszawa

²Centrum Nowych Technologii, Uniwersytet Warszawski, Warszawa

Większe zużycie antybiotyków makrolidowych, linkozamidów i streptogramin B (MLS_B) w leczeniu zakażeń *Staphylococcus aureus* doprowadziło do wzrostu liczby szczepów opornych na tę grupę antybiotyków. Wśród *S. aureus* najczęstszą przyczyną oporności na MLS_B jest modyfikacja miejsca docelowego działania leku warunkowana obecnością genów *erm* (ang. *erythromycin ribosome methylation*) kodujących metylazy rybosomalne. Celem niniejszej pracy była ocena oraz porównanie częstości występowania oporności typu MLS_B oraz genów *ermA*, *ermC* wśród 189 szczepów *S. aureus* opornych na metycylinę (MRSA) wyizolowanych z próbek różnego materiału klinicznego pobranych od pacjentów hospitalizowanych w roku 2012 oraz 2014. Wszystkim szczepom oznaczono wrażliwość na erytromycynę i klindamycynę oraz określono czy oporność ta miała charakter konstytutywny (kMLS_B) czy indukcyjny (iMLS_B). W przypadku szczepów opornych na erytromycynę, określono częstość występowania genów *ermA* oraz *ermC*. Łącznie wśród 189 badanych szczepów MRSA, 160 (85%) było opornych na erytromycynę. Charakter kMLS_B wykazywało 87 izolatów (46%), natomiast mechanizm iMLS_B - 45 szczepów (24%). Gen *ermA* był najczęstszym determinantem oporności na MLS_B - występował u 50% badanych szczepów. Wśród 40% izolatów wykazaliśmy obecność genu *ermC*, a 10% szczepów posiadało dwa determinanty oporności na MLS_B - geny *ermA* i *ermC*.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus aureus*, MLS_B, *ermA*, *ermC*, erytromycyna, klindamycyna, MRSA

ABSTRACT

Introduction: The rising use of macrolides and lincosamides has led to an increased resistance to macrolides, lincosamides, streptogramin B (MLS_B) in many bacteria and MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*) are one of most important. Resistance to MLS_B in *S. aureus* is commonly encoded by *erm* genes, which can be constitutive MLS_B (cMLS_B) or inducible MLS_B (iMLS_B). The purpose of this study was to compare the frequency of cMLS_B, iMLS_B, and MS phenotypes as well as the frequency of *ermA* and *ermC* genes amongst clinical isolates of MRSA from 2012 and 2014.

Methods: A total of 189 isolates of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) were collected in 2012 and 2014 in the Department of Microbiology of Clinical Hospital in Warsaw, Poland. The frequency of iMLS_B resistant isolates was determined using double disk diffusion test (D-test). For all erythromycin resistant strains, a PCR reaction was performed for detection of *ermA* and *ermC* genes.

Results: Among 189 MRSA, 160 were resistant to erythromycin and among them 87 were resistant also to clindamycin (cMLS_B phenotype). iMLS_B and cMLS_B resistance phenotypes had a frequency of 28% and 54% respectively. Among isolates with iMLS_B phenotype, 8 contained *ermA* gene, 35 isolates *ermC* gene, and 3 isolates both *ermA* and *ermC* genes. In the group of cMLS_B phenotype 53 isolates contained *ermA* gene, 20 isolates *ermC* and 13 isolates both genes *ermA* and *ermC*.

Conclusions: In the current study, cMLS_B was the most frequent phenotype. *ermA* gene was the most frequent gene found in cMLS_B and *ermC* in iMLS_B.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MLS_B, *ermA*, *ermC*, erythromycin, clindamycin, MRSA

WSTĘP

Staphylococcus aureus jest jednym z najważniejszych etiologicznych czynników zakażeń szpitalnych oraz pozaszpitalnych w Polsce i na świecie (22). Poważny problem w aspekcie zdrowia publicznego stanowią szczepy MRSA (ang. *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*), odporne na wszystkie antybiotyki β-laktamowe, oprócz najnowszych cefalosporyn skierowanych specjalnie przeciwko MRSA (20). W przypadku zakażeń MRSA, a także u osób uczulonych na antybiotyki β-laktamowe, alternatywnym wyborem w leczeniu zakażeń gronkowcami mogą być antybiotyki z grupy makrolidów, linkozamidów i streptogramin B (MLS_B), jeżeli nie występuje oporność na te leki (6,24). Jednak powszechne stosowanie tych antybiotyków w infekcjach gronkowcowych doprowadziło do selekcji szczepów opornych (10,24).

U gronkowców opisano dwa główne mechanizmy oporności na makrolidy, linkosamidy i streptograminy B: (1) mechanizm wypompowywania leku z komórki lub (2) modyfikacja miejsca docelowego działania leku (18). Pierwszy mechanizm oporności związany jest z obecnością pomp błonowych aktywnie wypompowujących antybiotyki z komórki kodowanych przez geny *msr* (ang. *macrolide efflux pumps*). Obecność tego mechanizmu prowadzi do oporności na makrolidy i streptograminy B (oporność typu MS_B). Drugim mechanizmem jest modyfikacja miejsca docelowego działania leku warunkowana obecnością genów *erm* (ang. *erythromycin ribosome methylation*) kodujących metylazy rybosomalne. Metylazy Erm powodują metylację adeniny w 23S rRNA, która jest wspólnym miejscem docelowego działania tych antybiotyków (11,30)

i nadają oporność w mechanizmie MLS_B konstytutywnym (kMLS_B) lub indukcyjnym (iMLS_B) (33). Ekspresja konstytutywna prowadzi do krzyżowej oporności na wszystkie MLS_B (8). Indukcyjny mechanizm oporności MLS_B występuje gdy produkcja metylaz jest wynikiem indukcji genów *erm* przez makrolidy z 14- i 15- członowym pierścieniem laktonowym, (np. erytromycyna, azytromycyna czy klarytromycyna). Linkozamidy (np. klindamycyna) nie są induktorem tego mechanizmu oporności, jednak stosowanie ich w terapii zakażenia wywołanego przez szczep iMLS_B jest obarczone ryzykiem niepowodzenia terapeutycznego, ponieważ prowadzi do selekcji mutantów kMLS_B (27). Jednak, założenie iż wszystkie szczepy odporne na erytromycynę są także odporne na klindamycynę jest nieprawidłowe i dodatkowo ogranicza możliwości terapeutyczne zakażeń gronkowcami (10,12). W związku z tym badanie występowania determinant oporności na antybiotyki grupy MLS_B jest istotne z punktu widzenia epidemiologii i pozwala na wyjaśnienie mechanizmów rozprzestrzeniania się oporności na antybiotyki u MRSA.

Celem niniejszej pracy była ocena oraz porównanie częstości występowania oporności typu MLS_B oraz genów *ermA*, *ermC* wśród szczepów MRSA wyizolowanych z próbek różnego materiału klinicznego pobranych od pacjentów hospitalizowanych w roku 2012 oraz 2014 w warszawskim szpitalu klinicznym.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne. Przedmiot badań stanowiło 189 szczepów MRSA wyhodowanych i oznaczonych do gatunku w Pracowni Diagnostyki Mikrobiologicznej w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Każdy szczep pochodził od innego chorego hospitalizowanego w Szpitalu Dzieciątka Jezus w Warszawie w latach 2012 i 2014. Identyfikację co do gatunku wykonano z użyciem automatycznego systemu VITEK 2 (bioMérieux). Jako kontrole posłużyły szczepy wzorcowe: *S. aureus* S35 – kontrola dodatnia MLS_B oraz *ermA*, *S. aureus* EO2507 – kontrola dodatnia *ermC*, *S. aureus* NCTC 8325 – kontrola ujemna MLS_B oraz kontrola ujemna *ermA* oraz *ermC* (19), *S. aureus* ATCC 29213 - kontrola dodatnia *mecA* oraz MRSA, *S. aureus* ATCC 25923 - kontrola ujemna *mecA* oraz MRSA (31).

Badanie lekowrażliwości szczepów. Ocenę wrażliwości badanych szczepów na metycylinę oraz makrolidy, linkozamidy i streptograminy B przeprowadzono metodą krążko-dyfuzyjną na podłożu Muller-Hinton agar stosując krążki firmy Oxoid z następującymi antybiotykami: cefoksytyna (FOX, 30 µg), klindamycyna (DA, 2 µg), erytromycyna (E, 15 µg) zgodnie z obowiązującymi rekomendacjami EUCAST (13). Fenotyp oporności MLS_B badano metodą dwóch krążków, z krążkiem z erytromycyną umieszczonym w pobliżu krążka z klindamycyną. W zależności od wielkości i kształtu stref zahamowania wzrostu wokół krążków z antybiotykami wyróżniono cztery fenotypy oporności: (1) iMLS_B - strefa zahamowania wzrostu wokół krążka z erytromycyną wskazująca na oporność (≤18 mm) i spłaszczenie strefy przy krążku z klindamycyną, tzw. D strefa, (2) kMLS_B – strefa zahamowania wzrostu wokół krążka z erytromycyną (≤18 mm) i klindamycyną, wskazująca na oporność (≤19 mm), (3) typ MS_B - strefa zahamowania wzrostu wokół krążka z erytromycyną, wskazująca na oporność (≤18 mm) oraz strefa zahamowania wzrostu wokół krążka z klindamycyną, wskazująca na wrażliwość (≥22 mm), (4) typ Ery^s - strefa zahamowania wzrostu wskazująca na wrażliwość wokół krążka z erytromycyną (≥21 mm) oraz klindamycyną (≥22 mm). Stosowano zawiesinę bakteryjną w roztworze soli fizjologicznej

o gęstości 0,5 McFarlanda i inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C. Identyfikację i interpretację fenotypów MRSA oraz MLS_B przeprowadzono zgodnie z obowiązującymi rekomendacjami EUCAST (16,32) i KORLD (35).

Izolacja DNA. Badane szczepy bakteryjne hodowano w bulionie tryptozowo-sojowym w 37°C przez noc, a następnie izolowano genomowe DNA z wykorzystaniem zestawu Genomic Mini Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) zgodnie z zaleceniami producenta.

Detekcja genów oporności z wykorzystaniem metody łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). U wszystkich badanych izolatów (n=189) poszukiwano obecności genu *mecA*, warunkującego oporność na metycylinę. W tym celu wykorzystano metodę PCR do amplifikacji genu *mecA* (147 par zasad, pz) z zastosowaniem opisanych wcześniej starterów (34) o następującej sekwencji *mecA*-Forward (5'-GTGAAGATATACCAAGTGATT3') oraz *mecA*-Reverse (5'-ATGCGCTATAGATTGAAAGGAT3'). Dla wszystkich izolatów opornych na erytromycynę wykonano reakcję PCR w celu wykrycia genów *ermA* i *ermC*. Zastosowano startery wg (28), o następującej kolejności nukleotydów: *ermA*-Forward (5'-TAT CTT ATC GTT GAG AAG GGA TT-3'), *ermA*-Reverse (5'-CTACACTTGGCT-TAGGATGAAA-3'), amplifikowany fragment 139 pz; *ermC*-Forward (5'-CTTGTTGAT-CACGATAATTTCC-3'), *ermC*-Reverse (5'-ATCTTTTAGCAAACCCGTATTC-3'), amplifikowany fragment 190 pz. Reakcje przeprowadzano przy następujących parametrach: wstępna denaturacja 94°C, 300 s; 30 cykli: denaturacja 94°C, 30s; przyłączanie starterów 55°C, 30s; elongacja 72°C, 120s; końcowa elongacja 72°C, 7 min. Produkty reakcji PCR były analizowane na 1% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydydny.

WYNIKI

Materiał do badań stanowiło łącznie 189 izolatów MRSA wykazujących oporność na metycylinę w teście dyfuzyjno-krażkowym. 126 szczepów MRSA pochodziło z 2012 roku a 63 izolaty z 2014 roku.

Wśród szczepów MRSA wyizolowanych w 2012 roku, 110 (87%) charakteryzowało się opornością na erytromycynę, z czego 54 (43%) izolaty prezentowały konstytutywny charakter oporności na MLS_B (kMLS_B) (Tabela I). Indukcyjny mechanizm MLS_B (iMLS_B) wykazywało 39 szczepów (31%). Ponadto, 17 izolatów (13%) prezentowało fenotyp MSB wskazujący na oporność na erytromycynę, wrażliwość na klindamycynę i ujemny wynik w teście na indukcyjność (Tabela I). Pozostałe 16 szczepów MRSA (13%) pozostawało wrażliwych zarówno na erytromycynę jak i na klindamycynę (Tabela I).

Tabela I. Częstość występowania fenotypu MLS_B wśród szczepów MRSA opornych na erytromycynę izolowanych w poszczególnych latach.

Rok izolacji	Ogółem MRSA	MRSA			
		ERY R	ERY R + CLI R c	ERY R + CLI R i ⁺	ERY R + CLI S i ⁻
2012	126 (100%)	110 (87%)	54 (43%)	39 (31%)	17 (13%)
2014	63 (100%)	50 (79%)	33 (52%)	6 (10%)	11 (18%)

Objaśnienia: Liczba procent poszczególnych fenotypów w odniesieniu do ogólnej liczby MRSA dla danego roku izolacji. ERY R – oporne na erytromycynę, CLI R c – konstytutywnie oporne na klindamycynę, CLI R i⁺ - indukcyjnie oporne na klindamycynę, CLI S i⁻ - wrażliwe na klindamycynę oraz ujemny wynik w teście na indukcyjność.

Z 2014 roku pochodziły 63 izolaty MRSA, w tym 50 (79%) było opornych na erytromycynę. Konstytutywny mechanizm oporności MLS_B wykazano u 33 szczepów MRSA (52%) (Tabela I). Oporność na erytromycynę i jednocześnie wrażliwość na klindamycynę wykryto łącznie u 17 szczepów. W tej grupie u 6 (12%) izolatów zaobserwowano spłaszczenie strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z klindamycyną w obecności erytromycyny, co świadczy o indukowalnym mechanizmie oporności na MLS_B (iMLS_B) a u 11 szczepów (17%) wykryto mechanizm MS_B (Tabela I). Wrażliwych na erytromycynę pozostawało 13 szczepów MRSA (21%) (Tabela II).

Tabela II. Częstość występowania genów *erm* wśród szczepów MRSA opornych na erytromycynę w poszczególnych latach

Rok izolacji	n (%) MRSA ERY R	<i>ermA</i>				<i>ermC</i>				<i>ermA</i> + <i>ermC</i>			
		n (%) [*]	cMLS _B (%)	iMLS _B (%)	CLI-S _r	n (%) [*]	cMLS _B (%)	iMLS _B (%)	CLI-S _r	n (%) [*]	cMLS _B (%)	iMLS _B (%)	CLI-S _r
2012	110 (100)	56 (51)	38 (68)	5 (9)	13 (23)	48 (44)	11 (23)	33 (69)	4 (8)	6 (5)	4 (67)	2 (33)	0
2014	50 (100)	23 (46)	15 (65)	3 (13)	5 (22)	17 (34)	9 (53)	2 (12)	6 (35)	10 (20)	9 (90)	1 (10)	0

Objaśnienia: Jako 100% dla danego roku izolacji przyjęto liczbę izolatów MRSA opornych na erytromycynę, n-ogółem, cMLS_B – oporność konstytutywna, iMLS_B – oporność indukcyjna, CLI-S_r – wrażliwe na klindamycynę oraz ujemny wynik w teście na indukcyjność, * Odsetek wśród izolatów opornych na erytromycynę

Łącznie wśród 189 szczepów MRSA wyizolowanych w warszawskim szpitalu klinicznym w latach 2012 i 2014, 160 (85%) było opornych a na erytromycynę. Ponadto, fenotyp kMLS_B wykazano u 87 szczepów (46%). Wrażliwość na klindamycynę wykazało łącznie 102 izolaty MRSA. W tej grupie 29 szczepów było także wrażliwych na erytromycynę, u łącznie 45 izolatów zaobserwowaliśmy spłaszczenie strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z klindamycyną od strony krążka z erytromycyną (kształt litery D), co świadczy o indukcyjnym charakterze oporności MLS_B (Tabela I). Pozostałe 28 szczepów wykazało ujemny wynik w teście na indukcyjność, w związku z czym ich fenotyp został określony jako MS_B.

Dla wszystkich 160 szczepów MRSA opornych na erytromycynę wykonano reakcję PCR w celu wykrycia genów *ermA* i *ermC*. Wyniki przedstawiono w tabeli II.

Wśród 110 szczepów MRSA opornych na erytromycynę wyizolowanych w 2012 roku, gen *ermA* jako jedyny determinant oporności wykryto u 56 (51%), gen *ermC* u 48 (44%) natomiast dwa determinanty oporności - geny *ermA* i *ermC* u 6 szczepów (5%) (Tabela II). Z kolei spośród 50 szczepów MRSA opornych na erytromycynę pochodzących z 2014 roku, gen *ermA* jako pojedynczy determinant oporności występował u 23 szczepów (46%), *ermC* u 17 szczepów (34%) a oba geny *ermA* i *ermC* wykryto u 10 izolatów (20%) (Tabela II).

Gen *ermA* był najczęściej wykrywany u szczepów charakteryzujących się konstytutywną ekspresją oporności MLS_B – w 2012 roku *ermA* wykazano u 38 szczepów (35%) a w 2014 u 15 (30%) (Tabela II). Wśród izolatów o fenotypie iMLS_B oraz MS_B gen *ermA* wykryto u odpowiednio 5% oraz 12% szczepów pochodzących z 2012 roku oraz 6% i 10% szczepów z 2014 roku (Tabela II).

Wśród izolatów pochodzących z 2012 roku niosących gen *ermC* jako pojedynczy determinant oporności 11 (10%) wykazywało konstytutywny charakter oporności fenotyp $kMLS_B$, 33 prezentowało fenotyp $iMLS_B$ a 4 fenotyp MS_B . W 2014 roku gen *ermC* najczęściej występował u szczepów $kMLS_B$ – 9 (18%). Ponadto, 5 izolatów z genem *ermC* charakteryzowało się indukcyjnym mechanizmem oporności ($iMLS_B$) oraz 6 szczepów o fenotypie oporności MS_B (Tabela II).

Oba geny *ermA* i *ermC* wykryto u 13 izolatów wykazujących konstytutywny charakter oporności MLS_B (4 szczepy z 2012 roku oraz 9 z 2014 roku) a także łącznie u 3 szczepów prezentujących fenotyp $iMLS_B$ (Tabela II).

Łącznie, gen *ermA* wykryto u 79 szczepów jako jedyny determinant oporności. 53 szczepy wykazywały $kMLS_B$ 8 szczepów $iMLS_B$. Gen *ermC* wykryto łącznie u 65 szczepów. Wśród tej grupy 20 wykazywało konstytutywną oporność MLS_B a 35 wykazywało indukcyjny charakter oporności na MLS_B (Tabela II). Oba geny *ermA* oraz *ermC* znaleziono u 16 szczepów. 13 z nich wykazywało konstytutywny charakter oporności MLS_B a 3 indukcyjną oporność na tę grupę antybiotyków (Tabela II). Wśród puli szczepów opornych na erytromycynę a wrażliwych na klindamycynę (fenotyp MS_B), gen *ermA* wykryto łącznie u 18 szczepów (13 z 2012 roku oraz 5 z 2014 roku), a gen *ermC* w sumie u 10 szczepów (4 z 2012 oraz 6 z 2014). Żaden ze szczepów opornych na erytromycynę i wrażliwych na klindamycynę nie posiadał dwóch genów *ermA* i *ermC*.

DYSKUSJA

Częste stosowanie antybiotyków z grup makrolidów, linkozamidów i streptogramin B, szczególnie w leczeniu ambulatoryjnym, spowodowało znaczny wzrost oporności na tę grupę leków wśród różnych gatunków bakterii na całym świecie (5,9). U szczepów MRSA izolowanych od chorych hospitalizowanych oporność ta występuje powszechnie (3,14).

Wśród przebadanych przez nas 189 szczepów MRSA izolowanych od pacjentów Szpitala Klinicznego Dzieciątka Jezus w Warszawie, było łącznie 160 izolatów (85%) opornych na erytromycynę, z czego 110 pochodziło z 2012 roku a pozostała część z 2014. W roku 2014 zaobserwowaliśmy wzrost o 9% liczby izolatów o fenotypie $kMLS_B$ w porównaniu z 2012 rokiem. Ponadto, w 2014 roku odnotowaliśmy spadek o 21% liczby szczepów o fenotypie $iMLS_B$. Tendencja ta od dłuższego czasu utrzymuje się wśród szczepów MRSA izolowanych od pacjentów warszawskiego szpitala klinicznego. Dla porównania, w 2006 roku *Młynarczyk* i wsp. (19) opisali fenotyp $iMLS_B$ u 50% szczepów MRSA oraz 48% $kMLS_B$. Wzrost częstości występowania fenotypu $kMLS_B$ obserwuje się wśród klinicznych izolatów MRSA na całym świecie. Potwierdzają to badania przeprowadzone przez *Almer* i wsp. (2) na puli szczepów izolowanych w USA w 2002 roku oraz szczepów pochodzących z Indii z lat 2012-2013 (4).

Nasze badania wykazały, że najczęściej występującym determinantem oporności na MLS_B u MRSA jest gen *ermA* (50% wszystkich szczepów). Gen *ermC* został wykryty u 40% badanych szczepów. Pozostałe 10% to izolaty posiadające jednocześnie oba geny: *ermA* i *ermC*. Wśród szczepów izolowanych zarówno w 2012 jak i 2014 roku, niosących gen *ermA* oraz oba geny *erm* dominował fenotyp $kMLS_B$. Podobnie *Saderi* i wsp. (25) wykazali, że gen *ermA* wyrażany konstytutywnie jako jedyny determinant oporności, występował najczęściej wśród badanej puli szczepów pochodzących z Iranu z 2011 roku. Nato-

miast Schmitz i wsp. (26) badając populację 493 szczepów MRSA opornych na makrolidy izolowanych w ramach europejskiego programu SENTRY 1997-1998 stwierdzili, że 82% z nich wykazywało konstytutywny typ oporności i zawierało gen *ermA*. Z kolei w USA, Steward i wsp. (29) w 2005 roku wykazali obecność genu *ermA* wyrażanego konstytutywnie u 33% szczepów a indukcyjnie u 17%.

Wyraźną zmianę obserwujemy natomiast w populacji szczepów z genem *ermC*. U większości szczepów z 2012 ekspresja *ermC* była indukowana, natomiast w 2014 szczepy niosące ten gen charakteryzowały się fenotypem kMLS_B. Wzrost częstości szczepów zawierających gen *ermC* może być wynikiem rozprzestrzeniania się w różnych latach innych klonów epidemicznych. Młynarczyk i wsp. (19) w 2006 roku badając izolaty z tego samego szpitala, wykazali obecność genu *ermC* jako jedynego genu warunkującego oporność tylko u 8% badanych izolatów. Obserwujemy zatem znaczny wzrost liczby szczepów niosących gen *ermC* na przestrzeni lat. Istotne jest także, że w obserwowanym okresie wzrósł odsetek izolatów posiadających jednocześnie oba determinanty oporności (1,7,23).

Podsumowując, przeprowadzone przez nas badania uwiaryściły zmiany jakie zaszły w strukturze populacji szczepów MRSA izolowanych od pacjentów Szpitala Klinicznego Dzieciątka Jezus w Warszawie w latach 2012 oraz 2014. Zaobserwowane zmiany mają najprawdopodobniej związek ze stosowaną w tym szpitalu presją selekcyjną antybiotyków (21). Wpływ na opisane przez nas zmiany mogła mieć również nasilona w ostatnich latach migracja ludzi (15,17).

PIŚMIENNICTWO

1. Aktas Z, Aridogan A, Kayacan CB, Aydin D. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. J Microbiol 2007; 45: 286–90.
2. Almer LS, Shortridge VD, Nilius AM i inni. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 43: 225–32.
3. Aydeniz Ozansoy F, Cevahir N, Kaleli I. Investigation of macrolide, lincosamide and streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples by phenotypical and genotypical methods. Mikrobiyol Bul 2015; 49: 1–14.
4. Banik A, Khyriem AB, Gurung J, Lyngdoh VW. Inducible and constitutive clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* in a northeastern indian tertiary care hospital. J Infect Dev Ctries 2015; 9: 725–31.
5. Bergman M, Huikko S, Huovinen P i inni. Macrolide and azithromycin use are linked to increased macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 3646–50.
6. Bhalariao DS, Kinikar AG, Roushani SB, Saini S. Prevalence of inducible clindamycin resistance among *Staphylococcal* isolates in a rural tertiary care hospital. Biomedicine 2013; 33: 196–9.
7. Bouchami O, Achour W, Ben Hassen A. Prevalence and mechanisms of macrolide resistance among *Staphylococcus epidermidis* isolates from neutropenic patients in Tunisia. Clin Microbiol Infect 2007; 13: 103–6.

8. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology* 2009; 7: 629–41.
9. Cizman M, Pokorn M, Seme K, Orazema, Paragi M. The relationship between trends in macrolide use and resistance to macrolides of common respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 475–7.
10. Dzierżanowska D. *Antybiotykoterapia praktyczna*. 5th ed. Medica Press, Bielsko-Biała: 2009.
11. Gaillard T, Dormoi J, Madamet M, Pradines B. Macrolides and associated antibiotics based on similar mechanism of action like lincosamides in malaria. *Malar J* 2016; 15: 85.
12. Ghanbari F, Ghajavand H, Havaei R i inni. Distribution of erm genes among *Staphylococcus aureus* isolates with inducible resistance to clindamycin in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res* 2016; 5: 62.
13. Giske C., Martinez L, Cantón R i inni. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance [Internet]. 2017.
14. Gul HC, Kilic A, Guclu AU, Bedir O, Orhon M, Basustaoglu AC. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistant phenotypes and genotypes for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. *Polish J Microbiol* 2008; 57: 307–12.
15. Karyński M, Krzysztoń-Russjan J, Grzesiowski P. Zmiany w epidemiologii inwazyjnych klonów MRSA w wybranych szpitalach w Polsce. *Wydaw. UR Rzesz.* 2012; 3: 311–7.
16. Leclercq R, Cantón R, Brown DFJ i inni. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection* 2013; 19: 141–60.
17. Łuczak-Kadłubowska A, Sulikowska A, Empel J i inni. Countrywide molecular survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Poland. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2930–7.
18. Matsuoka M, Endou K, Kobayashi H, Inoue M, Nakajima Y. A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 167: 221–7.
19. Młynarczyk G, Młynarczyk A, Szymanek-Majchrzak K, Łuczak M. Częstość występowania genów ermA, ermB, ermC i msrA/B u metycylino-opornych klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na erytromycynę izolowanych w Polsce. *Med Dośw Mikrobiol* 2006; 58: 183–90.
20. Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS i inni. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *Am J Med* 1993; 94: 313–8.
21. Otter JA, French GL. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet Infectious Diseases* 2010; 10: 227–39.
22. Paszko K, Michnowska E, Kurlenda J, Grinholc M, Nakonieczna J, Bielawski KP. MRSA distribution and epidemiological procedures evaluation at two hospitals in Northern Poland. *GMS Krankenhhyg. Interdiszip* 2011; 6: Doc19.

23. Piątkowska E, Piątkowski J, Przondo-Mordarska A. The strongest resistance of *Staphylococcus aureus* to erythromycin is caused by decreasing uptake of the antibiotic into the cells. *Cell Mol Biol Lett* 2012; 17: 633–45.
24. Rayner C, Munckhof WJ. Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. *Internal Medicine Journal* 2005; 35.
25. Saderi H, Emadi B, Owlia P. Phenotypic and genotypic study of macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLSB) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran, Iran. *Med Sci Monit* 2011; 17: BR48-53.
26. Schmitz FJ, Sadurski R, Kray A i inni. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 891–4.
27. Siberry GK, Tekle T, Carroll K, Dick J. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1257–60.
28. Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, Wiger K, Holck A. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with Beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2797–803.
29. Steward CD, Raney PM, Morrell AK i inni. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1716–21.
30. Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol* 2003; 330: 1005–14.
31. The Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing CLSI supplement M100S. 2016.
32. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 7.0, 2017. [Internet]. 2017.
33. Zelazny AM, Ferraro MJ, Glennen A i inni. Selection of strains for quality assessment of the disk induction method for detection of inducible clindamycin resistance in staphylococci: A CLSI collaborative study. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2613–5.
34. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5026–33.
35. Żabicka D, Hryniewicz W. Rekomendacje doboru testów do oznaczania wrażliwości bakterii na antybiotyki i chemioterapeutyki. Oznaczanie wrażliwości ziarniaków Gram-dodatnich z rodzaju *Staphylococcus* spp. 2009.

Otrzymano: 12 XII 2017

Adres Autora: 02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Inwazyjna choroba pneumokokowa u mieszkańców Bielska-Białej i okolic w latach 2007-2016

Invasive pneumococcal disease in the inhabitants of Bielsko-Biała and the surrounding area in the period 2007-2016

Katarzyna Gawlik¹, Wioletta Waksmańska¹, Jarosław Rutkiewicz^{1,2}

¹Akademia Techniczno-Humanistyczna, Wydział Nauk o Zdrowiu, Bielsko-Biała

²Powiatowa Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Bielsko-Biała

Choroba pneumokokowa wywoływana przez *Streptococcus pneumoniae*, stanowi istotny problem zdrowia publicznego pod względem epidemiologicznym, klinicznym i leczniczym. Zwalczanie i zapobieganie zakażeniom pneumokokowym powinno być priorytetowym działaniem w walce z chorobami zakaźnymi. Celem pracy była analiza przypadków zachorowań wywołanych przez *S. pneumoniae* na terenie powiatu bielskiego i miasta Bielska-Białej w latach 2007-2016.

Słowa kluczowe: *Streptococcus pneumoniae*, choroba pneumokokowa, epidemiologia

ABSTRACT

Introduction: *Streptococcus pneumoniae* is the main cause of mortality in the world. It causes general and local infections. The most exposed are young children and elderly people. The aim of the study was the analysis of the occurrence of infections caused by *S. pneumoniae* among the inhabitants of the district of Bielsko-Biała and the city of Bielsko-Biała in 2007-2016, including the number of cases and deaths of inhabitants in particular age groups and assessment of the type of clinical infections.

Material and Methods: The analysis of the occurrence of pneumococcal disease was based on the data collected by the Sanitary and Epidemiological Station in Bielsko-Biała.

Results: In the analyzed period, 99 cases of confirmed infection caused by *S. pneumoniae* were reported. It was the most common in children up to 4 years old and adults aged 50 years and over. The first symptoms of the disease appeared in the months of March and November. The pneumonia with sepsis, sepsis and meningitis dominated among the medical signs of the pneumococcal disease. 30 people died, including 2 people aged 4 years and 28 people aged 32-94 years. The most common cause of death was pneumonia with sepsis.

Conclusions: Within the ten-year period 2007-2016, the number of confirmed cases of disease caused by *S. pneumoniae* in Bielsko-Biala and its surroundings increased significantly. The pneumococcal disease may affect people of all ages; however, the special risk group includes children up to 4 years old and people aged 30 years and over. People over 50 are particularly at risk of undergoing unfavourable course of infection that can result in death. Infections of *S. pneumoniae* are seasonal and they occur most often in the autumn and winter, as well as infections caused by the influenza virus.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, pneumococcal disease, epidemiology

WSTĘP

Zakażenia pneumokokami przebiegające pod postacią inwazyjnej choroby pneumokokowej stanowią na świecie częstą przyczynę groźnych dla życia powikłań ogólnoustrojowych, włącznie ze zgonem, szczególnie u małych dzieci i osób starszych, powyżej 65 roku życia. Czynnikiem etiologicznym tych infekcji jest szeroko rozprzestrzeniona w środowisku bakteria *Streptococcus pneumoniae*, zwana historycznie pneumokokiem lub dwóinką zapalenia płuc, należąca do paciorkowców alfa-hemolizujących, której kolonie jednak w warunkach wzrostu beztlenowego wywołują beta-hemolizę. Pneumokoki są wyłącznie patogenami człowieka, występującymi zarówno u nosicieli jak i osób chorych. Szczepy kolonizujące, zasiedlające głównie jamę nosowo-gardłową, zwykle nie wywołują zakażeń. Do zakażenia szczepami patogennymi dochodzi drogą powietrzno-kropelkową lub przez bezpośredni kontakt (5, 6).

Pneumokoki charakteryzują się dużą różnorodnością, wyodrębniono wśród nich 97 typów serologicznych, różniących się budową otoczki polisacharydowej, która to struktura jest w głównej mierze odpowiedzialna za ich patogenność. Innym czynnikiem mającym wpływ na chorobotwórczość pneumokoków jest zdolność do wytwarzania białkowej toksyny – pneumolizyny (14).

Obraz kliniczny zakażenia pneumokokami zależy także od cech zainfekowanego organizmu i waha się od bezobjawowego nosicielstwa, do groźnych dla życia postaci inwazyjnych, przebiegających pod postaciami posocznicy czy zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i/ lub mózgu. Nosicielstwo jest zjawiskiem dość powszechnym, dotyczy najczęściej dzieci do 5 roku życia (20-40%) i maleje wraz z wiekiem, wynosząc u dorosłych od 5 do 10%. Częstość kolonizacji dróg oddechowych nie tylko zależy od wieku, ale także od warunków socjoekonomicznych, czynników uszkadzających nabłonek dróg oddechowych (infekcje wirusowe, palenie tytoniu) oraz pory roku. Częściej pneumokoki rozprzestrzeniają się w zbiorowiskach ludzkich, takich jak żłobki, przedszkola, domy opieki społecznej (4, 16). Rozwój infekcji pneumokokowej przeważnie nie jest następstwem długotrwałego nosicielstwa, lecz skutkiem kolonizacji nowym szczepem bakteryjnym. Szczególnie na zakażenie narażone są osoby o obniżonej odporności, chorzy z przewlekłymi chorobami płuc, wśierdza, chorobą alkoholową, cukrzycą, asplenią. Pneumokokowe zapalenie ucha środkowego, zatok przynosowych, zapalenie płuc bez bakteriemii, szerzą się przez ciągłość ze skolonizowanej tymi bakteriami nosogardzieli. Inwazyjna choroba pneumokokowa (ICHp) przebiegająca pod postacią posocznicy (sepsy), zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, lub zapalenia płuc z bak-

teriemią, jak również zapalenia kości, stawów, otrzewnej mają krwiopochodne pochodzenie. Wymienione postacie mogą występować pojedynczo lub współistnieć ze sobą. Warunkiem potwierdzenia podejrzenia rozpoznania choroby pneumokokowej jest wyizolowanie bakterii *S. pneumoniae* lub wykrycie jej kwasu nukleinowego lub antygenu, z miejsc, które w warunkach prawidłowych są jałowe, np., z krwi, płynów ustrojowych. IChP charakteryzuje się ciężkim przebiegiem, często prowadzi do powikłań i zgonów (16, 18, 22). Zakażenia spowodowane pneumokokami leczy się antybiotykami, kierując się wynikami badania oporności bakterii na leki. Najczęściej w praktyce klinicznej stosuje się penicyliny, makrolidy i cefalosporyny (2). Istotnym problemem leczenia zakażeń pneumokokowych ostatnich lat jest wzrastająca oporność *S. pneumoniae* na stosowane powszechnie antybiotyki, zwłaszcza u małych dzieci (13). Wydaje się, że najbardziej skuteczną metodą zapobiegania inwazyjnym zachorowaniom wywołanym przez pneumokoki są szczepienia ochronne.

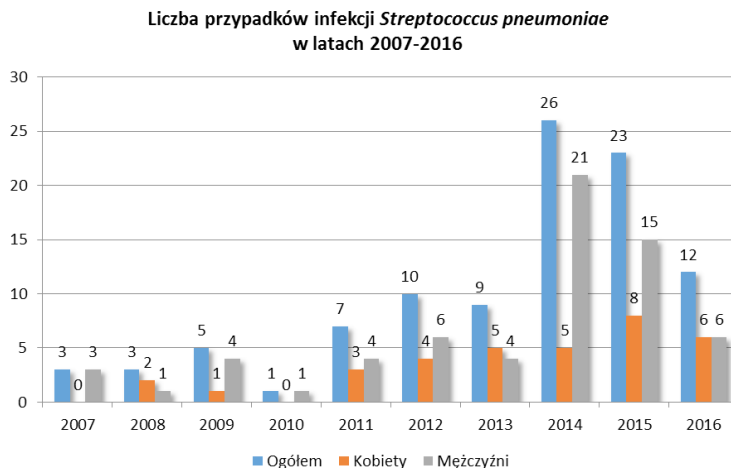
Celem pracy była analiza występowania zakażeń spowodowanych przez *Streptococcus pneumoniae* wśród mieszkańców powiatu bielskiego i miasta Bielsko-Biała w latach 2007-2016, z uwzględnieniem liczby zachorowań i zgonów chorych w poszczególnych grupach wiekowych oraz postaci klinicznych zakażeń.

MATERIAŁ I METODY

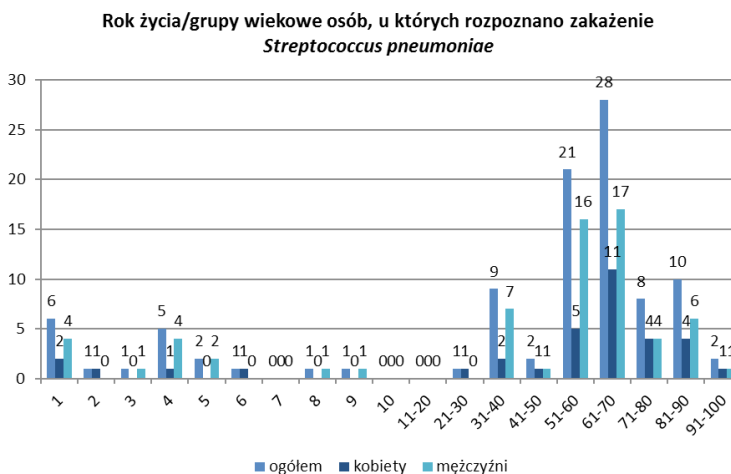
Analizą objęto 99 przypadków zachorowań zgłoszonych do Powiatowej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Bielsku-Białej w latach 2007-2016, których przyczyną była infekcja wywołana przez *S. pneumoniae*, potwierdzona badaniami bakteriologicznymi. Analizowano dane zawarte w „formularzach zgłoszenia podejrzenia lub rozpoznania zakażenia lub choroby zakaźnej” przesyłanych przez lekarzy dokonujących rozpoznania oraz informacje zebrane przez pracowników Państwowej Inspekcji Sanitarnej podczas wywiadów epidemiologicznych. Spośród wszystkich analizowanych przypadków 61 osób (62,0%) zamieszkiwało tereny miejskie, 38 osób (38,0%) mieszkało na wsi, 30 chorych (30,3%) mieszkało samotnie, 17 chorych (17,2%) będących w wieku produkcyjnym, nie pracowało. Leczenia szpitalnego wymagało 97 chorych (98,0%), 2 osoby (2,0%) leczono w warunkach ambulatoryjnych.

WYNIKI

W latach 2007-2016 odnotowano wśród mieszkańców Bielska-Białej i powiatu bielskiego 99 przypadków zachorowań, których przyczyną była infekcja *S. pneumoniae* potwierdzona badaniami bakteriologicznym. Zachorowało 65 mężczyzn (65,7%) i 34 kobiety (34,3%). W analizowanym okresie najwięcej zachorowań odnotowano w 2016 roku - 26 przypadków i w 2015 roku - 23 przypadki (Ryc. 1). Najmłodszy chory nie ukończył 2 miesiąca życia, najstarszy miał 94 lata (mediana wieku 60 lat, średnia arytmetyczna 51 lat). Najwięcej zachorowań u dzieci odnotowano w 1 roku życia, u osób starszych w przedziale wiekowym 61-70 lat. Najczęściej chorowały dzieci do 4 roku życia (13 dzieci) oraz dorośli po 50 roku życia (69 osób) (Ryc. 2). Najwięcej zachorowań przypadało na okres jesienno-zimowy, tj. od września do marca - 74 % wszystkich analizowanych przypadków. Pierwsze objawy infekcji najczęściej pojawiały się w miesiącu marcu i listopadzie. Najmniej zachorowań odnotowano w lipcu i sierpniu (Ryc. 3).

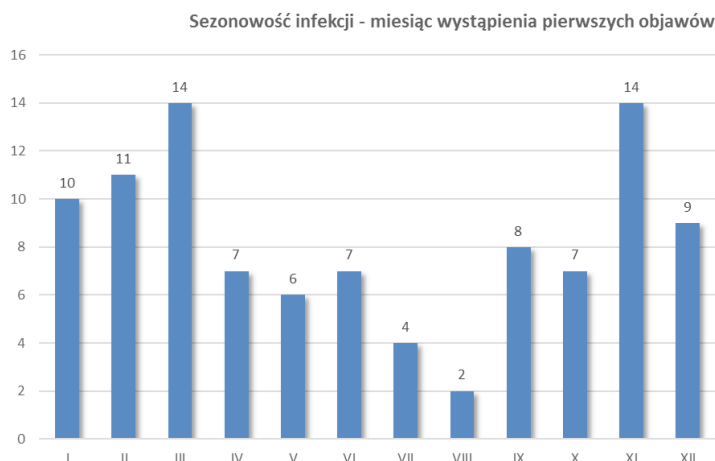


Rycina 1. Zachorowania spowodowane przez *Streptococcus pneumoniae* wśród mieszkańców Bielska-Białej i powiatu bielskiego w latach 2007-2016, z uwzględnieniem płci chorych osób.



Rycina 2. Zachorowania na chorobę pneumokokową mieszkańców Bielska-Białej i powiatu bielskiego wg. wieku, z uwzględnieniem płci.

Wśród 99 zgłoszonych przypadków zachorowań u 29 osób rozpoznano posocznicę, w 10 przypadkach posocznicę wraz z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych, w 39 przypadkach posocznicę z zapaleniem płuc. Odnotowano 15 przypadków zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i 1 przypadek zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych z towarzyszącym zapaleniem płuc oraz 5 przypadków zapalenia płuc, w tym w jednym przypadku zapalenia płuc w materiale biologicznym zidentyfikowano zarówno bakterie *Streptococcus pneumoniae* jak i *Haemophilus influenzae* (Ryc. 4).

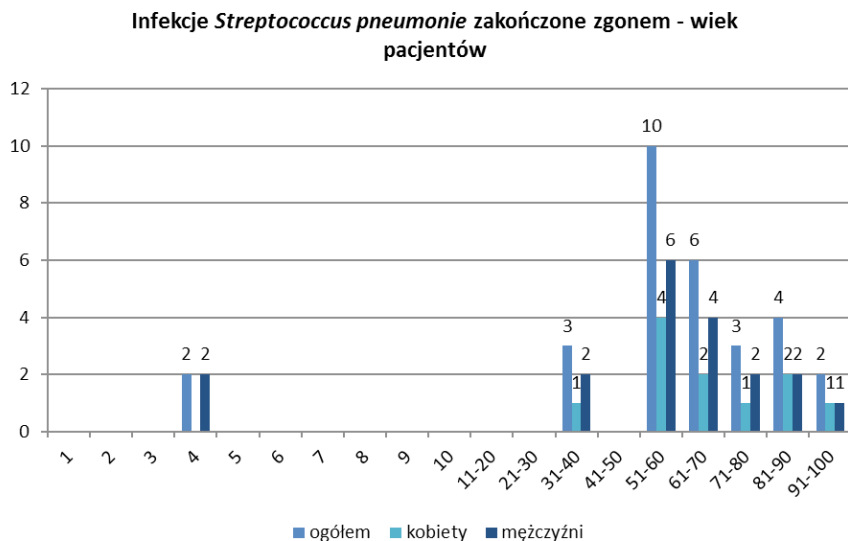


Rycina 3. Rozkład sezonowy zachorowań mieszkańców Bielska-Białej i powiatu bielskiego wywołanych przez *Streptococcus pneumoniae*.



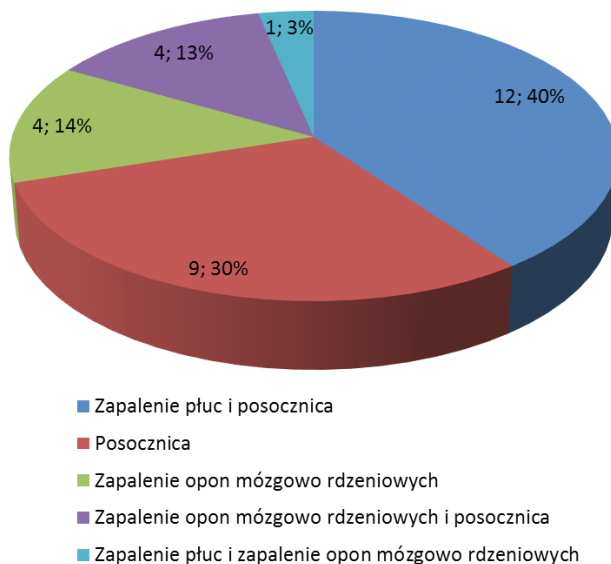
Rycina 4. Postacie kliniczne infekcji wywołanej przez *Streptococcus pneumoniae*.

Przebieg infekcji w 30 przypadkach zakończył się zgonem (zmarło 30,3% chorych) w tym 29,2% chorujących mężczyzn (19 zgonów na 65 chorujących) oraz 32,4% chorujących kobiet (11 zgonów na 34 chorujące). Wśród zmarłych było dwoje dzieci w wieku 4 lat, pozostałe osoby to dorośli w przedziale wiekowym pomiędzy 32 a 94 rokiem życia (Ryc. 5). Przyczyną zgonu w 12 przypadkach było zapalenie płuc z towarzyszącą posocznicą, w 9 przypadkach posocznica, w 7 przypadkach jako przyczynę zgonu ustalono zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (w 3 przypadkach z posocznicą, w jednym z zapaleniem płuc) (Ryc. 6).



Rycina 5. Zakażenia wywołane przez *Streptococcus pneumoniae* zakończone zgonem, wg płci i wieku chorych.

Postacie kliniczne infekcji - zgon



Rycina 6. Postacie kliniczne zakażeń inwazyjnych, które spowodowały zgon chorych.

DYSKUSJA

Zakażenia pneumokokowe są istotnym problemem zdrowia publicznego, nie tylko w Polsce, ale także na całym świecie. Szacuje się, że globalna liczba przypadków choroby pneumokokowej u dzieci poniżej 5 roku życia wynosi 14,5 milionów rocznie, z których 800 tys. kończy się śmiercią (17). Pod względem klinicznym szczególnie niebezpieczne są zakażenia inwazyjne. W Polsce przypadki inwazyjnej choroby pneumokokowej (IChP) rejestrowane są przez Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny (NIZP-PZH) oraz Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Diagnostyki Bakteryjnej Zakażeń Ośrodkowego Układu Nerwowego (KOROUN) w Narodowym Instytucie Leków (7).

Według danych NIZP-PZH liczba zarejestrowanych przypadków IChP w latach 2009-2015 stopniowo wzrastała, z 274 do 979 przypadków. Ogólny wskaźnik zapadalności na IChP wynosił 0,72/100 tys. mieszkańców w 2009 roku, a do 2015 roku zwiększył się ponad trzykrotnie i wynosił 2,55/100 tys. mieszkańców. W 2016 roku zarejestrowano w Polsce 966 przypadków IChP, a wskaźnik zapadalności uległ nieznacznemu obniżeniu i wyniósł 2,51/100 tys. (1).

Z danych przedstawionych przez KOROUN wynika, że w latach 2010-2015 liczba przypadków IChP wzrosła z 298 do 701. Największą zapadalność zaobserwowano u dzieci poniżej 2 roku życia i dorosłych powyżej 65 roku życia. W 2015 roku zapadalność na IChP w tych grupach wiekowych wynosiła odpowiednio 4,08/100 tys. i 4,83/100 tys., a w 2016 roku u dzieci w wieku do 2 lat wzrosła do 5,43, u osób powyżej 65 roku życia wynosiła 4,76/100 tys. (8). W Polsce, w latach 2011-2013, najwyższy wskaźnik zapadalności odnotowano u dzieci poniżej 1 roku życia 4,28/100000 i osób powyżej 85 roku życia 4,62/100000 (21). W województwie śląskim w latach 2011-2015 zarejestrowano w sumie 325 przypadków IChP, odnotowując najwięcej przypadków w 2015 roku – 88 chorych. Ogólny wskaźnik zapadalności na IChP kształtował się od 1,23/100000 w 2011 roku do 1,92/100 tys. w 2015 roku. Spośród wszystkich postaci inwazyjnych najczęściej występowała posocznica (155 zachorowań) i zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych i/lub mózgu (127 zachorowań) (23). Analiza zakażeń inwazyjnych szczepami otoczkowymi w latach 2000-2013 przeprowadzona w Szpitalu Bielańskim w Warszawie wykazała, że *S. pneumoniae* był odpowiedzialny za ponad połowę wszystkich zakażeń inwazyjnych u pacjentów i był najczęstszą przyczyną bakteriemii lub posocznicy (11).

Z zebranych przez Powiatową Stację Sanitarno-Epidemiologiczną w Bielsku-Białej danych wynika, że w latach 2007-2011 u mieszkańców Bielska-Białej i powiatu bielskiego, populacji liczącej około 334 tys. osób, odnotowano łącznie 19 przypadków zachorowań na chorobę pneumokokową (zapadalność w kolejnych latach na 100 tys. mieszkańców wynosiła odpowiednio: 0,9, 0,9, 1,5, 0,3, 2,1), a w latach 2012-2016 tych przypadków było już 80 (zapadalność na 100 tys. w kolejnych latach wynosiła odpowiednio: 3,0, 2,7, 7,9, 7,0, 3,6). Najczęstszą postacią kliniczną inwazyjnej choroby pneumokokowej zgłoszonej do PSSE w Bielsku-Białej w latach 2007-2016 była posocznica – 78 przypadków, w tym w 49 przypadkach przebiegająca z zapaleniem płuc lub z zapaleniem opon mózgowo-rdzeniowych. Uważa się, że liczba zachorowań na IChP w Polsce jest niedoszacowana, ze względu na rzadkie zlecenie posiewów krwi oraz rozpoczynanie antybiotykoterapii przed pobraniem materiału do badań mikrobiologicznych (7).

Epidemiologiczny raport dotyczący występowania chorób zakaźnych w Europie podaje, że do europejskiego systemu nadzoru zgłoszono w 2015 roku 21118 potwierdzonych przypadków IChP, wskaźnik zapadalności wynosił 5,6/100 tys. i był wyższy niż w roku 2014, w którym wynosił 4,8/100 tys. (17528 przypadków). Najwyższy wskaźnik zapadalności odnotowano u dzieci poniżej 1 roku życia (12,9/100 tys.) i osób starszych, powyżej 65 roku życia (16,1/100 tys.). W latach 2011-2014 ogólny wskaźnik zapadalności kształtował się na poziomie 4,8-5,8/100 tys. Ze wszystkich rozpoznanych w Europie inwazyjnych postaci zakażeń *S. pneumoniae*, najczęściej występowała posocznica oraz zapalenie płuc z bakterią. Najniższe wskaźniki zachorowań obserwowano w miesiącach letnich, a najwyższe w miesiącach zimowych, od listopada do marca (19). Zjawisko sezonowości występowania IChP potwierdzają także inni autorzy (3, 9, 20).

W Polsce ogólny wskaźnik śmiertelności z powodu IChP w latach 2011-2015 wyniósł 29,8 %, a w 2016 38,2%. Najwyższy był w grupie wiekowej powyżej 65 roku życia, w 2015 roku wyniósł 46%, a w 2016 49,3% oraz u dzieci poniżej 2 lat, odpowiednio wyniósł 5,3% i 6,7% (8). W województwie śląskim w latach 2011-2015 z powodu inwazyjnych zakażeń wywołanych przez *S. pneumoniae* zmarło 37 osób, najczęściej umierały osoby powyżej 50. roku życia (23). Ryzyko zgonu wzrasta wraz z wiekiem i jest związane ze zmniejszeniem odporności i zjawiskiem fizjologicznego procesu starzenia się organizmu (15). Na świecie większość zgonów z powodu infekcji *S. pneumoniae* odnotowuje się w krajach rozwijających się, upatrując przyczynę tego stanu rzeczy w ubóstwie, niskim poziomie higieny, niedostatecznym dostępie do antybiotyków i szczepionek. Warto zauważyć, że w krajach tych obserwuje się także wysoką częstość zakażeń HIV, które sprzyjają rozwojowi infekcji pneumokokowych (12).

S. pneumoniae wywołuje również zakażenia o charakterze nieinwazyjnym, zwłaszcza zapalenie ucha środkowego, zapalenie zatok i pozaszpitalne zapalenie płuc. Choroby te nie stanowią bezpośredniego zagrożenia dla życia człowieka, mogą jednak powodować ciężkie i niebezpieczne powikłania (14). *S. pneumoniae* jest najczęstszym patogenem zapalenia płuc u osób starszych (stanowi 70% zdiagnozowanych przypadków). Śmiertelność z powodu zapalenia płuc wynosi około 5%, wzrasta do 30% w przypadkach powikłanych bakterią lub posocznicą (10).

PODSUMOWANIE

1. W 10-letnim okresie, obejmującym lata 2007-2016, liczba potwierdzonych przypadków zachorowań mieszkańców Bielska-Białej i okolic spowodowanych przez *S. pneumoniae* znacząco wzrosła.
2. Choroba pneumokokowa może dotyczyć osób w każdym wieku, jednak grupę szczególnego ryzyka stanowią dzieci do 4 roku życia i osoby powyżej 30 roku życia. Osoby powyżej 50 roku życia są szczególnie narażone na niepomyślny przebieg infekcji zakończony zgonem.
3. Infekcje *S. pneumoniae* mają charakter sezonowy, najczęściej występują w okresie jesienno-zimowym, podobnie jak infekcje powodowane wirusem grypy.

PIŚMIENNICTWO

1. Choroby zakaźne i zatrucia w Polsce www.pzh.gov.pl 28.12.17.
2. Chrostowska-Wynimko J, Demkow U, Górski P i inni. Postępy w pneumonologii w 2012. *Pneumonol Alergol Pol* 2013; 81: 162-81.
3. Ciruela P, Broner S, Izquierdo C. et al. Invasive pneumococcal disease rates linked to meteorological factors and respiratory virus circulation (Catalonia, 2006–2012). *BMC Public Health* 2016; 13: 400.
4. Garlicki A. Choroby infekcyjne OUN. W: Boroń-Kaczmarek, Wiercińska –Drapała A. Choroby zakaźne i pasożytnicze. PZWL Warszawa 2017: 91-143.
5. Heczko P, Wróblewska M, Pietrzyk A. Mikrobiologia lekarska. Wyd Lekarskie PZWL Warszawa 2014: 111-2.
6. Henriques-Normark B, Toumanen E. The Pneumococcus Epidemiology, Microbiology, and Pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013; 3: a010215.
7. https://www.mp.pl/szczepienia/praktyka/ekspert/pneumokoki_ekspert/161657,epidemiologia-inwazyjnej-choroby-pneumokokowej, 28.12.17.
8. Inwazyjna Choroba pneumokokowa w Polsce www.koroun.edu.pl 28.12.17.
9. Iroh Tam PY, Madoff LC, O'Connell M, Pelton SI. Seasonal variation in penicillin susceptibility and invasive pneumococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* 2015; 34(4): 456–7.
10. Jabłońska J, Suchacz M. Ostre zakażenia dolnych dróg oddechowych. W: Boroń-Kaczmarek A, Wiercińska-Drapała A. Choroby zakaźne i pasożytnicze. PZWL Warszawa 2017: 165-81.
11. Jackowska T, Pawlik K. Analiza zakażeń inwazyjnych szczepami otoczkowymi w latach 2000-2013-observacje własne. *Post Nauk Med* 2014; 9: 638-43.
12. Kinabo GD, van der Ven A, Msuya LJ, Shayo AM i inni. Dynamics of nasopharyngeal bacterial colonisation in HIV-exposed young infants in Tanzania. *Tropical Medicine and International Health* 2013; 18(3): 286–95.
13. Korona-Główniak I, Niedzielski A, Malm A, Niedzielski G. Serotypes and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* from adenoids in preschool children with recurrent upper respiratory tract infections. *Pol J Microbiol* 2013; 62: 385-90.
14. Korona-Główniak I, Malm A. *Streptococcus pneumoniae*- kolonizacja a rozwój choroby pneumokokowej. *Post Microbiol* 2015; 54(4): 309-19.
15. Krone CL, van de Groep K, Trzciński K i inni. Immunosenescence and pneumococcal disease: an imbalance in host–pathogen interactions. *Lancet Respir Med*. 2014; 2: 141-53.
16. Łopaciuk U. *Streptococcus pneumoniae*. *Med. Dypl* 2015; 2: 75-8.
17. O'Brien K, Wolfson L, Watt J i inni. Burden of disease caused by global estimates. *Lancet* 2009; 374: 893-902.
18. Ochoa-Gondar O, Hospital I, Vila-Corcoles A i inni. Prevalence of high, medium and low-risk medical conditions for pneumococcal vaccination in Catalan middle-aged and older adults: a population-based study. *BMC Pub Health* 2017; 17: 610-8.
19. Roczny raport epidemiologiczny na temat chorób zakaźnych w Europie <https://ecdc.europa.eu/> 28.12.17.

20. *Sahuquillo-Arce JM, Ibanez-Martinez E, Hernandez- Cabezas A* i inni. Influence of environmental conditions and pollution on the incidence of *Streptococcus pneumoniae* infections. ERJ open research 2017; 3(4): 00014-2017.
21. *Skoczyńska A, Kuch A, Sadowy E* i inni. Recent trends in epidemiology of invasive pneumococcal disease i Poland. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015; 34: 779-87.
22. *Szenborn L, Matkowska-Kocjan A*. Serotyp 1 *Streptococcus pneumoniae* - co wiemy o bakterii i wywołanych przez nią zakażeniach. Forum Zakażeń 2013; 4(1): 59-64.
23. Sytuacja epidemiologiczna inwazyjnej choroby pneumokokowej w województwie śląskim w latach 2011- 2015. wsse.katowice.pl/index.php?c=getfile&id=289 28.12.17.
24. *Skoczyńska A*. Epidemiologia inwazyjnej choroby pneumokokowej. 2017. https://www.mp.pl/szczepienia/praktyka/ekspert/pneumokoki_ekspert/161657,epidemiologia-inwazyjnej-choroby-pneumokokowej.

Otrzymano: 30 I 2018 r.

Adres Autora: 43-300 Bielsko-Biała, ul. Willowa 2, Wydział Nauk o Zdrowiu, Akademia Techniczno-Humanistyczna

Analiza pełnogenomowych sekwencji trzech wyosobnionych z materiału klinicznego od ludzi szczepów *Salmonella enterica* serotyp Enteritidis ST11 o obniżonej wrażliwości na ciprofloksacynę

Analysis of draft whole genome sequences of three clinical strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis ST11 with decreased susceptibility to ciprofloxacin

Katarzyna Piekarska, Tomasz Wołkowicz*, Natalia Wolaniuk,
Katarzyna Zacharczuk, Magdalena Rzeczkowska, Rafał Gierczyński

Department of Bacteriology, National Institute of Public Health
– National Institute of Hygiene, Warsaw, Poland

Paleczki *Salmonella* są drugą w kolejności, najczęstszą przyczyną bakteryjnych biegunek. W większości przypadków zakażenia są samoograniczające się. W ciężkich i uzasadnionych przypadkach lekiem z wyboru w leczeniu salmonelozy u dorosłych są fluorochinolony. W prezentowanej pracy przeanalizowano sekwencje DNA uzyskane metodą sekwencjonowania pełnogenomowego (WGS) z trzech izolatów *S. Enteritidis* o obniżonej wrażliwości na ciprofloksacynę (MIC = 0,19 mg/l), wyizolowanych od trzech niepowiązanych epidemiologicznie pacjentów. Wszystkie szczepy należały do ST11 i posiadały dwa bardzo podobne wzory MLVA (3-9-5-4-1 and 3-10-5-4-1). Jedynym wykrytym mechanizmem oporności była substytucja Ser83Tyr w podjednostce A gyrazy (GyrA).

ABSTRACT

Introduction: *Salmonella* is the second the most common bacterial pathogen causing food-borne diarrhoea. Most of *Salmonella* infections are self-limiting but severe invasive infections which require antibiotic treatment. Nowadays, fluoroquinolones are the drug of choice for the treatment of invasive gastrointestinal infections due to non-typhoidal *Salmonella* in adults but the number of *Salmonella* serotypes with decreased susceptibility to ciprofloxacin has increased during recent years.

Material and Methods: Three *Salmonella* Enteritidis strains with decreased susceptibility to ciprofloxacin (MIC 0.19 mg/l) were isolated from apparently unrelated patients. The strains were sequenced and their draft genomes were analysed for the occurrence of resist-

ance genes, mutations, plasmids, and genotyped using MLST, MLVA and whole genome SNP analysis.

Results: All three strains belonged to ST11, and have closely related MLVA patterns (3-9-5-4-1 and 3-10-5-4-1). SNP analysis showed from 2 to 26 SNP between all the strains. Ser83Tyr substitution in the GyrA subunit was the only resistance mechanism found in all analysed strains.

Conclusions: Our results support previous reports on dissemination of *S. Enteritidis* strains with altered GyrA and reduced susceptibility to fluoroquinolones.

Keywords: Antimicrobial resistance, fluoroquinolones, *Salmonella* Enteritidis, whole genome sequencing, WGS, QRDR

INTRODUCTION

Salmonella is the second (after *Campylobacter*) the most common bacterial pathogen causing food-borne diarrhoea. Furthermore, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Enteritidis (*S. Enteritidis*) is one of the main serovars associated with human salmonellosis worldwide. In the EU, *S. Enteritidis* is responsible for 44.4% of salmonellosis confirmed cases reported in 2014 (4). In Poland, the rate is even higher, reaches 75% of all reported strains in 2013 and 2014 (15). Most of *Salmonella* infections result in self-limiting gastroenteritis, and antimicrobial therapy is not recommended. However, severe invasive infections require antibiotic treatment. Nowadays, fluoroquinolones (FQ) are the drug of choice for the treatment of invasive gastrointestinal infections due to non-typhoidal *Salmonella* in adults. Unfortunately, the number of *Salmonella* isolates of different serotypes with decreased susceptibility to ciprofloxacin ($\text{MIC} \geq 0.125 \text{ mg/l}$) has increased during recent years in many countries (2, 6, 9). The decrease of susceptibility to FQ in *Salmonella* is worth attention due to the high risk of treatment failure when FQ are used. Noteworthy, WHO has put the FQ resistant *Salmonella* on the list of 12 bacteria for which new antibiotics are urgently needed (WHO: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>).

Resistance to FQ is typically a consequence of mutations in chromosomal genes of DNA gyrase (*gyrA*, *gyrB*) and topoisomerase IV (*parC*, *parE*), changes in drug entry and efflux, as well as acquired of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrD*, *aac(6)-Ib-cr*, *qepA* and *oqxAB*) (7, 12). Single mutation in quinolone resistance determining region (QRDR) of *gyrA* gene in *Salmonella* usually results in reduced ciprofloxacin susceptibility (10). Additional mutations and their accumulation can further increase FQ resistance leading to high level resistance (7). Although efflux and PMQR reduce FQ susceptibility the both support emergence of increased resistance level in the presence of therapeutic quinolone concentration (13, 14).

In this study, we investigated the mechanisms associated with decreased susceptibility to ciprofloxacin, and we first time presented the draft genome sequence of *Salmonella* Enteritidis isolated from human in Poland.

MATERIAL AND METHODS

During a routine study conducted in our lab in 2016, three strains with decreased susceptibility to ciprofloxacin (MIC = 0.19 mg/l) were isolated from apparently unrelated patients with *Salmonella* Enteritidis detected in the stool culture. The isolates were identified by biochemical tests and were further confirmed by serotyping in accordance with the White-Kauffmann-LeMinor scheme. Antimicrobial susceptibility was evaluated for ciprofloxacin, ampicillin, ceftazidime, ceftriaxone, gentamicin, amikacin and trimethoprim-sulphamethoxazole by E-test method and interpreted according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST: <http://www.eucast.org/>) recommendations. The three isolates were screened for the presence of the aforementioned PMQR determinants by PCR amplification using methods described previously (11). Furthermore, the isolates were subjected to whole genome sequencing analysis (WGS). All steps of WGS (DNA purification, library preparation, sequencing) were performed in Public Health England Genomic's Services using HiSeq Illumina platform. Genomes of the three investigated strains were assembled with Velvet and SPAdes assemblers using applications available on CGE web-site (Center for Genomic Epidemiology; www.cge.dtu.dk/services). In silico, *Salmonella* serotype prediction was performed with SeqSero 1.2 algorithm (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/seqsero/>). Plasmid occurrence was analysed in silico with PlasmidFinder tool (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>). Occurrence of resistance genes and chromosomal mutations was analysed using ResFinder 3.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder-3.0/>) algorithm. Genetic relatedness of the analysed strains was determined by SNP analysis performed using CSI Phylogeny algorithm (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>). MLST type was assigned using MLST 1.8 algorithm (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>). Additional MLVA type was assigned by the methodology recommended by ECDC (3). The number of VNTRs was predicted from WGS data using CLC Sequence Viewer 7 software.

RESULTS AND DISCUSSION

All the tested isolates exhibited a susceptibility to ampicillin, ceftazidime, ceftriaxone, gentamicin, amikacin and trimethoprim-sulphamethoxazole and showed decreased susceptibility to ciprofloxacin with MIC = 0.19 mg/ml. None of the PMQR genes was detected by PCR.

The WGS analyses were performed as a part of ENGAGE project. All sequence reads are deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) database under the study ID: PRJEB23743. *In silico*, *Salmonella* serotype prediction confirmed that all the strains belongs to the Enteritidis serotype.

Multilocus sequence typing (MLST) showed that all tested strains shared the same sequence type (ST11), representing the most common ST among Enteritidis, Gallinarum, Pullorum group (1) (all important data are combined in Table I). Strains no. 172/16 and 173/16 revealed the same MLVA pattern 3-9-5-4-1 and one strain (no. 178/16) showed pattern 3-10-5-4-1. Further SNP analysis revealed the three strains were closely related (similarity matrix showed in Table I). Only two SNPs were found between strains no. 172/16 and 173/16, and strain no. 178/16 showed only 24 SNPs compared to strain 172/13, and 26 SNPs compared to strain 173/16.

Table I. Combined data and results obtained from all analysed *S. Enteritidis* isolates.

Sample no.	Collection date	Serotype	MLST	MLVA	Resistance mechanisms	Plasmid replicons	SNP matrix		
							172/16	173/16	178/16
172/16	2016-06	Enteritidis (9:g,m:-)	ST11	3-9-5-4-1	gyrA S83Y	IncFIB(S), IncFII(S), ColRNAI	0	2	24
173/16	2016-06	Enteritidis (9:g,m:-)	ST11	3-9-5-4-1	gyrA S83Y	IncFIB(S), IncFII(S), ColRNAI	2	0	26
178/16	2016-07	Enteritidis (9:g,m:-)	ST11	3-10-5-4-1	gyrA S83Y	IncFIB(S), IncFII(S), ColRNAI	24	26	0

Using PlasmidFinder ColRNAI, IncFIB and IncFII plasmid replicons were found in all three strains. Noteworthy, IncFII is the common incompatibility group among *Salmonella* virulence plasmids. IncFII plasmids encoding for resistance traits were also reported in *S. Enteritidis* (8). Consequently, ResFinder analysis showed that using even non-restrictive parameters (70% for sequence identity, 60% for minimum length) no resistance genes were detected in genomes of the three tested strains, including range of PMQRs (all databases are constantly updated and available on the web site <https://cge.cbs.dtu.dk/services/data.php>). However, WGS revealed that all tested strains possessed altered GyrA due to substitution of serine to tyrosine in codon 83 (Ser83Tyr). This point mutation was previously reported in *Salmonella* strains, as well as in other bacteria with reduced susceptibility to ciprofloxacin (2, 15).

Our results support previous reports on dissemination of *S. Enteritidis* strains with altered GyrA and reduced susceptibility to fluoroquinolones. Despite the low MIC to ciprofloxacin, occurrence of GyrA mutation (Ser83Tyr) in the tested strains may contribute to the appearance of further mutations in other QRDRs (*ang.* quinolone Resistance Determining Regions) leading to increased resistance. Notably, mutation in GyrA (Ser83Tyr) was found *in vitro* in *S. Typhimurium* as the first occurring mutation in GyrA triggered by ciprofloxacin concentration equal to MIC 6 (mg/L) (5). Assuming, the reduced susceptibility is a favourable adaptation to low concentration of these antimicrobials, our finding may reflect *S. Enteritidis* response to exposition to fluoroquinolones in its primary environment – animals.

Acknowledgments

This research was supported partly by internal-grant from NIPH-NIH (no. 3/EM/2016) and EFSA grant: ENGAGE (no. GP/EFSA/AFSCO/2015/01/CT1).

EFSA Disclaimer: The conclusions, findings, and opinions expressed in this Genome Announcement reflect only the view of the authors and not the official position of the European Food Safety Authority.

WPROWADZENIE

Pałeczki *Salmonella* są drugą w kolejności, najczęstszą (po pałeczkach *Campylobacter*) przyczyną biegunk bakteryjnych. Za zdecydowaną większość salmoneloz w Polsce odpowiadają pałeczki *Salmonella enterica subsp. enterica* należące do serotypu Enteritidis izolowane z ok. 75% wszystkich raportowanych w latach 2013 i 2014 przypadków (15). W Unii Europejskiej, pałeczki *S. Enteritidis* stanowią również dominujący serotyp tego patogenu, jednak izolowane są tylko z 44,4% wszystkich raportowanych przypadków (4). Większość zakażeń pałeczkami *Salmonella* przebiega w postaci nieżytu żołądkowo-jelitowego. Najczęściej są to zakażenia samoograniczające się i terapia antybiotykowa jest niewskazana (również ze względu na możliwość wywołania nosicielstwa u leczonego pacjenta). Jednakże ciężkie przypadki inwazyjnej salmonelozy wywołanej odzwierzęcymi typami serologicznymi *Salmonella* nie-Typhi i nie-Paratyphi A, B, C wymagają antybiotykoterapii. W przypadku leczenia inwazyjnych postaci zapalenia jelita u dorosłych lekami z wyboru są antybiotyki z grupy fluorochinolonów (FQ). Niestety w wielu krajach obserwowany jest wzrost odsetka izolatów pałeczek *Salmonella* wykazujących obniżoną wrażliwość na ciprofloksacynę ($MIC \geq 0.125$ mg/l) (2, 6, 9). Z tych względów, jak również w związku z ryzykiem niepowodzenia terapeutycznego, poziom oporności na fluorochinolony wśród pałeczek *Salmonella* wymaga monitorowania. Na problem ten zwraca uwagę także WHO (*ang.* World Health Organisation) przyjmując oporne na fluorochinolony pałeczki *Salmonella* jako jeden z 12 patogenów alarmowych (WHO: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>).

Oporność na fluorochinolony jest najczęściej skutkiem mutacji w rejonach QRDR (*ang.* quinolone resistance determining region) chromosomalnych genów *gyrA* i *gyrB* kodujących podjednostki gyrazy (GyrA i GyrB) lub *parC* i *parE* kodujących podjednostki topoizomerazy IV (ParC i ParE). U pałeczek *Salmonella* pojedyncza mutacja w regionie QRDR genu *gyrA* skutkuje obniżeniem wrażliwości na ciprofloksacynę (10). Pojawienie się kolejnych mutacji w rejonach QRDR gyrazy i topoizomerazy IV oraz ich kumulacja powoduje wzrost poziomu oporności (7). Natomiast niski poziom oporności na fluorochinolony może być związany z aktywnością pomp błonowych lub obecnością plazmidowo kodowanych mechanizmów zwanych PMQR (*ang.* plasmid-mediated quinolone resistance) związanych z obecnością genów (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrD*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* and *oqxAB*) (7, 12). Obecność tych mechanizmów może odgrywać istotną rolę w selekcji szczepów opornych na wysokie stężenia FQ (13, 14).

W poniższej pracy opisano analizę sekwencji nukleotydowych uzyskanych metodą pełnogenomowego sekwencjonowania (WGS) z trzech wyosobnionych z materiału klinicznego od ludzi szczepów *S. Enteritidis* o obniżonej wrażliwości na ciprofloksacynę. Szczegółowym celem analizy było ustalenie mechanizmów warunkujących oporność na antybiotyki oraz określenie podobieństwa genetycznego tych izolatów.

MATERIAŁ I METODY

Trzy izolaty *S. Enteritidis* wykazujące obniżoną wrażliwość na ciprofloksacynę ($MIC = 0,19$ mg/l) zostały wyizolowane z próbek kału trzech niepowiązanych pacjentów w 2016 roku podczas rutynowo prowadzonej diagnostyki. Wszystkie izolaty zostały zidentyfiko-

wane do poziomu podgatunku przy użyciu klasycznych, próbowkowych testów biochemicznych. Serotyp szczepów określono zgodnie ze schematem White-Kauffmann-LeMinor-a. Wrażliwość badanych szczepów na takie antybiotyki jak: ciprofloksacyna, ampicylina, ceftazydym, ceftriakson, gentamycyna, amikacyna oraz trimetoprim-sulfametoksazol określono posługując się paskami z gradientem stężeń antybiotyku (E-test, bioMérieux) i interpretowano zgodnie z wytycznymi European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2016) (<http://www.eucast.org/>). Dodatkowo wszystkie badane izolaty zostały przebadane na obecność plazmidowo kodowanych mechanizmów oporności na FQ - PMQR (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrD*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*) z użyciem techniki PCR według wcześniej opisanej metodyki (11).

Ponadto, badane szczepy poddano pełnogenomowemu sekwencjonowaniu DNA (WGS). Wszystkie etapy sekwencjonowania pełnogenomowego (izolacja i oczyszczanie DNA, przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania) zostały przeprowadzone przez Public Health England Genomic's Services przy użyciu technologii Illumina i platformy HiSeq. Genomy trzech badanych szczepów złożono do kontigów przy użyciu dwóch algorytmów, Velvet i SPAdes, z zastosowaniem aplikacji dostępnych na stronie CGE (Center for Genomic Epidemiology; www.cge.dtu.dk/services). Przynależność do serotypu *Salmonella* Enteritidis została potwierdzona *in silico* z wykorzystaniem algorytmu SeqSero 1.2 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/seqsero/>). Przy użyciu aplikacji PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) poszukiwano plazmidów w badanych sekwencjach pełnogenomowego DNA. Obecność genów jak i mutacji chromosomalnych warunkujących oporność na antybiotyki została określona *in silico* z wykorzystaniem algorytmu ResFinder 3.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder-3.0/>). Podobieństwo genetyczne badanych izolatów określono z wykorzystaniem trzech technik: MLST, MLVA oraz pełnogenomowej analizy mutacji punktowych (SNP). Typ MLST został oznaczony z wykorzystaniem aplikacji MLST 1.8 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>). Analizę MLVA przeprowadzono zgodnie z metodyką rekomendowaną przez ECDC (3), zaś liczbę tandemowych sekwencji powtórzonych (VNTR) odczytano z pełnogenomowych sekwencji nukleotydowych z zastosowaniem oprogramowania CLC Sequence Viewer 7. Analizę SNP przeprowadzono z wykorzystaniem algorytmu CSI Phylogeny (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>).

WYNIKI I DYSKUSJA

Badane trzy izolaty *S. Enteritidis* charakteryzowały się wrażliwością na ampicylinę, ceftazydym, ceftriakson, gentamycynę, amikacynę oraz trimetoprim-sulfametoksazol. Jedynie w przypadku ciprofloksacyny odnotowano obniżoną wrażliwość. Badanie PCR nie wykazało obecności poszukiwanych genów kodujących determinanty PMQR.

Pełnogenomowe sekwencjonowanie zostało przeprowadzone w ramach projektu. Uzyskane odczyty sekwencji zostały zdeponowane w bazie European Nucleotide Archive (ENA) pod numerem identyfikacyjnym badania PRJEB23743. Genoserotypowanie *Salmonella* potwierdzało *in silico* przynależność wszystkich badanych szczepów do serotypu Enteritidis.

Typowanie MLST wskazało, że wszystkie badane izolaty reprezentują ten sam typ ST11 (wszystkie najważniejsze wyniki zostały zebrane i przedstawione w Tabeli I). ST 11 jest najczęściej występującym typem w grupie pałeczek *Salmonella* Enteritidis, Gallinarum, Pullorum (1). Szczepy nr 172/16 i 173/16 posiadały ten sam typ MLVA (3-9-5-4-1), zaś szczep 178/16 posiadał bardzo podobny wzór 3-10-5-4-1. Pełnogenomowa analiza SNP potwierdziła bliskie genetyczne podobieństwo badanych izolatów (macierz podobieństwa została przedstawiona w Tabeli I). Wykryte zostały jedynie 2 mutacje różniące szczepy 172/16 i 173/16, zaś szczep 178/16 posiadał 24 mutacje punktowe w porównaniu do szczepu 172/16 i 26 mutacji w porównaniu do szczepu 173/16.

Analiza z wykorzystaniem algorytmu PlasmidFinder wykazała obecność plazmidowych ori replikacyjnych ColRNAI, IncFIB i IncFII w genomach wszystkich badanych izolatów. Plazmidy z grupy niezgodności IncFII występują powszechnie u pałeczek *Salmonella* i kodują mechanizmy wirulencji. Według Kim i wsp. (8) plazmidy z tej grupy niezgodności mogą również przenosić geny oporności u pałeczek *S. Enteritidis*.

Analiza genów kodujących determinanty oporności nie wykazała obecności żadnych znanych mechanizmów oporności zdeponowanych w bazie danych algorytmu ResFinder, nawet przy niskiej swoistości wyszukiwania (70% identyczności sekwencji i 60% minimalnego pokrycia długości sekwencji). Analiza ta obejmowała większość opisanych genów oporności w tym szerokie spektrum PMQR (baza sekwencji jest stale aktualizowana i dostępna na stronie <https://cge.cbs.dtu.dk/services/data.php>). Wynik ten jest zgodny z wynikiem uzyskanym techniką PCR. Analiza obecności znaczących mutacji chromosomalnych wykazała, że wszystkie trzy badane izolaty posiadają zmienione białko GyrA w wyniku substytucji seryny na tyrozynę w kodonie 83 (Ser83Tyr). Mutacja ta w sposób istotny wpływa na powstawanie oporności na fluorochinolony, w tym także oporności na wysokie stężenia antybiotyku, zarówno u pałeczek *Salmonella* jak i u wielu innych patogenów (2, 15).

Wyniki uzyskane w prezentowanej pracy wskazują na rozpowszechnienie szczepów *S. Enteritidis* wykazujących zmniejszoną wrażliwość na fluorochinolony jedynie w następstwie zmian w białku GyrA, gdyż użyta metodologia badawcza pozwala z dużym prawdopodobieństwem wykluczyć obecność innych znanych genetycznych determinant antybiotykooporności u badanych szczepów. Pomimo relatywnie niskiej wartości MIC ciprofloksacyny badanych izolatów, obecność substytucji Ser83Tyr w podjednostce GyrA może w dłuższej perspektywie prowadzić do selekcji dalszych mutacji znaczących w innych regionach QRDR, prowadząc w konsekwencji do kolejnych mutacji i wzrostu poziomu oporności na FQ. Podobnie mutacja Ser83Tyr w białku GyrA została opisana w szczepach *S. Typhimurium* jako pierwsza pojawiająca się zmiana w następstwie ekspozycji na ciprofloksacynę i skutkująca opornością na poziomie MIC 6 mg/ml (5). Zakładając, że zmniejszona wrażliwość jest korzystną adaptacją do niskich stężeń tych antybiotyków, opisywana sytuacja może odzwierciedlać reakcję *S. Enteritidis* na ekspozycję na fluorochinolony w ich pierwotnym środowisku tj. u zwierząt hodowlanych.

Badanie było przeprowadzone w ramach planu naukowego NIZP-PZH (nr 3/EM/2016) oraz grantu EFSA: ENGAGE (nr GP/EFSA/AFSCO/2015/01/CT1).

REFERENCES

1. *Achtman M, Wain J, Weill F-X, et al.* Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens*, 2012; 8:e1002776. doi:10.1371/journal.ppat.1002776.
2. *Casas MR, Camargo CH, Soares FB i inni.* Presence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in gyrase and topoisomerase in *Salmonella enterica* isolates with resistance and reduced susceptibility to ciprofloxacin. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2016; 85: 85-9. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.01.016.
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Laboratory standard operating procedure for multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. Stockholm: ECDC; 2016.
4. *EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control).* The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* 2016; 14:4634, 231 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4634
5. *Fàbrega A, Soto SM, Ballesté-Delpierre C i inni.* Impact of quinolone-resistance acquisition on biofilm production and fitness in *Salmonella enterica*. *J Antimicrob Chemother*, 2014; 69: 1815-24. doi: 10.1093/jac/dku078.
6. *Hakanen AJ, Kotilainen P, Pitkänen S i inni.* Reduction in fluoroquinolone susceptibility among non-typhoidal strains of *Salmonella enterica* isolated from Finnish patients. *J Antimicrob Chemother*, 2006; 57: 569-72. doi: 10.1093/jav/dkl1002.
7. *Hooper DC, Jacoby GA.* Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci*, 2015; 1354: 12-31. doi: 10.1111/nyas.12830.
8. *Kim Y, Bae IK, Jeong SH i inni.* Occurrence of IncFII plasmids carrying the *bla*_{CTX-M-15} gene in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis sequence type 11 in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011; 71: 171-3. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.05.004.
9. *Lee HY, Su LH, Tsai MH i inni.* High rate of reduced susceptibility to ciprofloxacin and ceftriaxone among nontyphoid *Salmonella* clinical isolates in Asia. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009; 53: 2696-9. doi: 10.1128/AAC.01297-08.
10. *Ouabdesselam S, Tankovic J, Soussy CJ.* Quinolone resistance mutations in the *gyrA* gene of clinical isolates of *Salmonella*. *Microb Drug Resist*, 1996; 2: 299-302. doi: 10.1089/mdr.1996.2.299.
11. *Piekarska K, Wołkowicz T, Zacharczuk K i inni.* Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-resistant clinical Enterobacteriaceae isolated in a tertiary hospital in Warsaw, Poland. In *J Antimicrob Agents*, 2015; 45: 238-43. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.09.019.
12. *Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV.* Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol*, 2014; 22: 438-45. doi: 10.1016/j.tim.2014.04.007.
13. *Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC.* The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis*, 2006; 6: 629-40. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70599-0.

14. *Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME* i inni Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on. *Drug Resist Updat*, 2016; 29: 13-29. doi: 10.1016/j.drug.2016.09.001.
15. *Sadkowska-Todys M, Czarkowski MP*. Salmonellosis in Poland in 2014. *Przegl Epidemiol*, 2016; 70: 358-66.

Otrzymano: 29 XII 2017 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

e-mail: twolkowicz@pzh.gov.pl, Tel. +48 22 54 21 263

Rola parametrów stanu zapalnego w kale pacjentów z zakażeniem *Clostridium difficile*: badania wstępne

The role of inflammatory parameters in feces of patients with *Clostridium difficile* infections: preliminary study

Małgorzata Aptełkorz¹, Monika Kabala¹, Barbara Wiechula¹,
Celine Harmanus², Ed Kuijper², Gayane Martirosian¹

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Wydziału Lekarskiego Śląskiego
Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

²Department of Microbiology, Leiden University Medical Center,
2333 ZA Leiden, Albinusdreef 2, The Netherlands

Celem pracy była ocena przydatności oznaczenia kalowej kalprotektyny i laktoferyny w rutynowej, laboratoryjnej diagnostyce zakażeń *C. difficile* (CDI) i w prognozowaniu przebiegu choroby. Z wyhodowanych z kału 39 pacjentów z CDI 39 szczepów *C. difficile*, 24 zaklasyfikowano do PCR RT 027, po dwa - do PCR RT 010 i 014, rybotypów 11 szczepów nie ustalono. Dwa izolaty *C. difficile* PCR RT 027 (8,3%) wykazały oporność na 4 antybiotyki – MDR; w próbkach kału tych pacjentów poziom kalprotektyny przekraczał punkt odcięcia około 7-10 krotnie, a poziom laktoferyny około 24-32 krotnie. Stężenie laktoferyny było znamienne wyższe ($p < 0,005$) u pacjentów z dodatnimi wynikami toksyn w kale, jednak nie udało się określić znamienności w przypadku kalprotektyny. Dalsze badania na większej grupie pacjentów z CDI będą przydatne, aby wykazać rolę kalprotektyny i laktoferyny, jako ważnych markerów stanu zapalnego.

Słowa kluczowe: *Clostridium difficile*, CDI, kalprotektyna, laktoferyna

ABSTRACT

Introduction: *Clostridium difficile* infections (CDI), also known as antibiotic-associated diarrhoea, can result in severe infections in the intestinal tract with systemic complications. A high activity of neutrophils, monocytes and other cells during intestinal infection can result in production of several proteins, including lactoferrin and calprotectin that can be detected in fecal samples. The aim of this study was to evaluate fecal lactoferrin and calprotectin determination in routine diagnostic practice as a predictor for disease progressing.

Methods: Fecal samples of 39 patients suspected for CDI were studied for presence of antigen GDH (C. Quick Quick Check Complete, TechLab, USA) and *C. difficile* toxins A and/or B (C. diff. Quick Check Complete (TechLab, USA), C. DIFFICILE TOX A/B II™ (TechLab, USA); and toxin A gene (Illumigene® *C. difficile*, Meridian Bioscience, USA). In fecal samples lactoferrin (LACTOFERRIN SCAN™; TechLab, USA) and calprotectin levels (Calprest; Eurospital; Italy) were also determined. Fecal samples were cultured for *C. difficile*, isolated strains were identified, ribotyped and MICs to 11 antibiotics were determined.

Results: Of 39 cultured strains, 24 belonged to PCR RT 027, two strains to each of PCR RT 010 and 014, and 11 strains were not typeable. All isolated *C. difficile* strains were resistant to ciprofloxacin, and two (multidrug resistant, MDR) strains belonging to PCR RT 027 (8,3%) were resistant to at least 4 antibiotics (clindamycin, erythromycin, moxifloxacin and rifampicin). In fecal samples (n=33) with free *C. difficile* toxins, lactoferrin level was 0,2 - 286,9 µg/mL (median 173,0; IQR=188,1), and calprotectin level 12,8 - 786,8 mg/kg (median 318,5; IQR=220,2). The lactoferrin concentration was significantly higher ($p<0,005$) in patients with toxin positive tests than in samples without detected toxins, however significant differences were not observed in the calprotectin concentration. Interestingly, fecal samples of two patients infected with MDR strains of PCR RT 027, had calprotectin levels surpassing a cut off between ~7-10 times, similarly as lactoferrin level ~24-32 times.

Conclusions: Further studies on larger group of patients with CDI are required to demonstrate that lactoferrin and calprotectin can be used as markers of inflammation.

Key words: *Clostridium difficile*, CDI, calprotectin, lactoferrin

WSTĘP

Zakażenia *Clostridium difficile* (CDI) często są przyczyną powikłań u pacjentów poddawanych leczeniu przeciwbakteryjnemu. Biegunki poantybiotykowe wywołane przez *C. difficile* stanowią około 20% przypadków biegunk związanych z antybiotykoterapią. Zaburzenia równowagi mikroflory jelitowej, jako niepożądane następstwo antybiotykoterapii, umożliwia namnażanie się bakterii oraz produkcję dwóch toksyn - A i B *C. difficile* - głównych czynników zjadliwości. Ich synergistyczne efekty powodują oprócz gromadzenia się płynów i uszkodzenia błon śluzowych nabłonka oraz uwalnianie cytokin prozapalnych. Jednoczesna aktywacja i rekrutacja neutrofili w przewodzie pokarmowym wywołują odpowiedź zapalną, towarzyszącą zarówno postaciom łagodnej biegunki oraz zagrażającym życiu powikłaniom, takim jak rzekomobłoniaste zapalenie jelita grubego (PMC) czy ostre rozdęcie okrężnicy (14).

Z uwagi na nadmierną aktywację leukocytów (neutrofili, monocytów i innych komórek) w trakcie toczących się procesów zapalnych w jelitach produkowane są przez te komórki białka: laktoferyna i kalprotektyna (7, 21, 22, 23). Wśród zalet tych biomarkerów wymienić należy ich stabilność w pobranych próbkach kału: kalprotektyna jest stabilna przez tydzień, laktoferyna nawet do 2 tygodni (17).

Zakażenie *C. difficile* według definicji ESGCD (europejskiej grupy badawczej zakażeń *C. difficile*) stwierdza się na podstawie takich klinicznych objawów jak: biegunka - co

najmniej 3 luźne stolce w ciągu 24 godz. (i/lub ostre rozdęcie okrężnicy), gorączka, ból brzucha, leukocytoza, potwierdzone jednym z poniższych kryteriów laboratoryjnych:

- obecność toksyn A/B *C. difficile* w kale lub genów toksyn,
- obecność toksynotwórczego szczepu *C. difficile* w kale,
- endoskopowe rozpoznanie rzekomobłoniastego zapalenia jelita grubego,
- bądź potwierdza się zakażenie *C. difficile* histopatologicznym badaniem podczas kolektomii lub autopsji (10, 11).

Wieloośrodkowe badania przeprowadzone przez Hensgens i wsp. (13) wskazują na wysoką śmiertelność wśród pacjentów z CDI - zwiększa się 2,5-krotnie. To podkreśla znaczenie profilaktyki, zapobiegania oraz szukania nowszych metod terapeutycznych. Przede wszystkim bardzo ważna jest szybka i trafna diagnoza CDI, ponieważ pozwala na wdrożenie odpowiedniego, zoptymalizowanego leczenia pacjentów i tym samym zmniejsza śmiertelność.

Aktualna laboratoryjna diagnostyka pacjentów z podejrzeniem CDI polega na badaniu kału poprzez wykonanie testów immunoenzymatycznych czy molekularnych potwierdzających obecność toksyn, antygeny GDH lub DNA *C. difficile* (1). Precyzyjna i szybka diagnoza CDI ma kluczowe znaczenie dla optymalizacji leczenia i zapobiegania CDI, jednak osiągnięcie tego celu nie jest łatwe. Dlatego u pacjentów z podejrzeniem CDI diagnostyka posiłkuje się także analizą innych, pomocniczych biomarkerów, np. stężeniem albumin w surowicy czy leukocytozą, a także czynnikami stanu zapalnego jelit (9, 11).

Celem pracy była ocena przydatności określania wartości laktoferyny i kalprotektyny w kale pacjentów z CDI w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej, a także jako wskazówek dotyczących dalszego przebiegu choroby i optymalizacji leczenia.

MATERIAŁ I METODY

Przebadano 39 próbek kału pacjentów z podejrzeniem zakażenia *C. difficile* hospitalizowanych w szpitalach województwa śląskiego.

Próbki kału badano na obecność antygeny GDH (*C. Quick Quick Check Complete*, TechLab, USA - wykrywa GDH na poziomie $\geq 0,8$ ng/mL) oraz toksyn A i/lub B *C. difficile* dwoma testami immunoenzymatycznymi: *C. diff. Quick Check Complete* (TechLab, USA) i *C. DIFFICILE TOX A/B II*™ (TechLab, USA). Ponadto obecność genu toksyny A w próbkach kału badano molekularnym testem *Illumigene® C. difficile* (Meridian Bioscience, USA) opartym na izotermicznej amplifikacji DNA.

Próbki kału badano także testami immunoenzymatycznymi zgodnie z instrukcjami producentów wskazującymi stężenie laktoferyny [*LACTOFERRIN SCAN*™; TechLab, USA; stężenie $\geq 7,25$ µg/mL (g) - wynik dodatni] i stężenie kalprotektyny (*Calprest*; Eurospital; Italy; stężenie > 50 mg/kg kału - wynik dodatni).

Dodatkowo kał (~1 mL/lub g) posiewano na selektywne podłoża dla *C. difficile* [*CDIF* - *chromID*™ *C. difficile* i *CLO* - Columbia agar z cykloseryną, cefoksytiną i amfoterycyną B (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France)], które inkubowano, co najmniej 48 godz. w 37°C w warunkach beztlenowych (A35 Whitley anaerobic Workstation, UK). Kolonie wykazujące charakterystyczny koński zapach i żółto-zieloną fluorescencję w świetle UV, a w preparacie cylindryczne Gram dodatnie laseczki identyfikowano w automatycznym systemie - *VITEK 2 Compact* (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France). Wyhodowane szczepy *C. difficile* przechowywano do dalszych badań w -80°C w mikrobankach (*Microbank*™ Bacterial and Fungal Preservation System, PRO-LAB DIAGNOSTICS, UK).

Oznaczanie lekowrażliwości. Lekowrażliwość badanych szczepów *C. difficile* oznaczono metodą rekomendowaną przez EUCAST (Europejski Komitet ds. Oznaczania Lekowrażliwości, wersja 6.0) polegającą na wyznaczeniu minimalnego stężenia antybiotyku hamującego wzrost bakterii (MIC) z użyciem pasków E-test (bioMerieux, Marcy L'Etoile, France). Badanie przeprowadzono zgodnie z zaleceniem producenta pasków E-test z: metronidazolem (zakres 0,016-256 µg/mL), wankomycyną (0,016-256 µg/mL), moksifloksacyną (0,002-32 µg/mL), ciprofloksacyną (0,002-32 µg/mL), rifampicyną (0,002-32 µg/mL), erytromycyną (0,016-256 µg/mL), klindamycyną (0,015-256 µg/mL), benzylopenicyliną (0,016-256 µg/mL), imipenemem (0,002-32 µg/mL), amoksacyliną z kwasem klawulanowym (0,016-256 µg/mL) i piperacyliną z tazobaktamem (0,016-256 µg/mL).

W badaniach, jako materiały odniesienia wykorzystano szczepy wzorcowe z kolekcji ATCC: *Clostridium difficile* ATCC 700057, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 oraz *Bacteroides thetaiotamicron* ATCC 29741. Wszystkie wyniki kontroli znajdowały się w akceptowalnych granicach.

Badania molekularne. Z wyhodowanych drobnoustrojów izolowano DNA zestawem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) zgodnie z instrukcją producenta, rybotypowanie przeprowadzono w Department of Medical Microbiology Leiden University Medical Center w Holandii z użyciem specyficznych starterów 16S (A321BacS-16S: 5'-GTGCGGCTGGATCACCTCCT-3') oraz 23S (A322BacAS-23S: 5'-CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC-3'). Uzyskane produkty poddawano 3 godzinnej elektroforezie pod napięciem 85V i obrazowano w Bio-Rad Molecular Imager® GelDoc™ XR. Wyniki interpretowano korzystając z BioNumerics v6.6 (5).

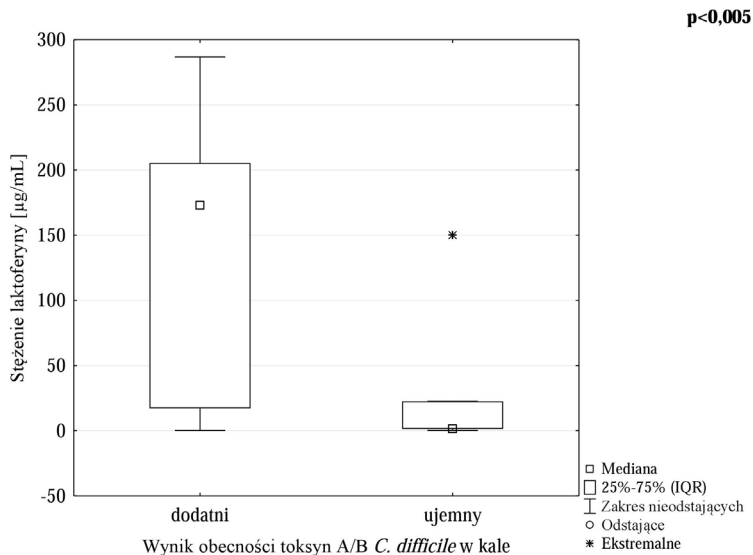
Analiza statystyczna. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem pakietu kalkulacyjnego Microsoft Excel oraz StatSoft, Inc. (2014). STATISTICA (data analysis software system), version 12. www.statsoft.com.

Za istotny statystycznie przyjęto poziom istotności o wartości $p < 0,05$.

WYNIKI

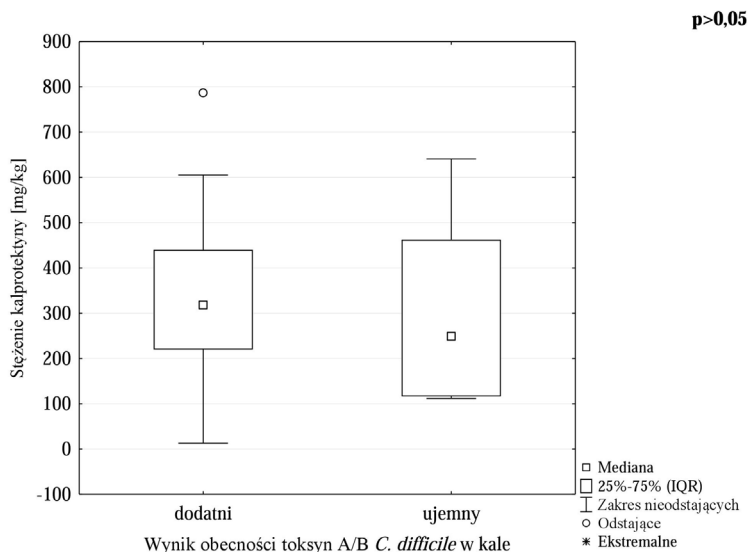
Przebadano 39 próbek kału hospitalizowanych pacjentów z podejrzeniem zakażenia *C. difficile*, pochodzących od 22 kobiet w wieku od 20 do 90 lat (mediana 74,5) oraz 17 mężczyzn w wieku od 52 do 75 lat (mediana 69,5).

W 6/39 (15,4%) badanych próbkach kału testy immunoenzymatyczne i badania molekularne (test Illumigene) nie wykazały toksyn A/B *C. difficile*; stężenie laktoferyny w tych próbkach wynosiło od 0,3 - 150,1 µg/mL [mediana 1,6; rozstęp ćwiartkowy, IQR=21,1 (ang. *Interquartile Range*)] a stężenie kalprotektyny wynosiło od 111,9 - 641,1 mg/kg (mediana 248,9; IQR=346,1). Natomiast w próbkach kału ze stwierdzonymi toksynami stężenie laktoferyny wynosiło od 0,2 - 286,9 µg/mL (mediana 173,0; IQR=188,1) a stężenie kalprotektyny wynosiło od 12,8 - 786,8 mg/kg (mediana 318,5; IQR=220,2). Stężenie laktoferyny w dodatnich próbkach kału było znamienne wyższe ($p < 0,005$) niż w próbkach ujemnych. Pomimo, że przeciętne stężenie kalprotektyny (mediana) u pacjentów z CDI ponad sześciokrotnie przewyższało wartość przyjętą jako wynik dodatni (> 50 mg/kg), nie było istotnej statystycznie różnicy w porównaniu ze stężeniem kalprotektyny u pacjentów z ujemnym wynikiem na obecność toksyn A/B *C. difficile*. Stężenia laktoferyny i kalprotektyny u pacjentów z dodatnim i ujemnym wynikiem na obecność toksyn A/B *C. difficile* w kale przedstawiono na Rycinie 1 i 2.



Rycina 1. Stężenie laktoferyny w próbkach kału pacjentów z dodatnim i ujemnym wynikiem na obecność toksyn A i/lub B *C. difficile*.

W próbkach z dodatnim wynikiem na obecność toksyn A i/lub B *C. difficile* mediana stężenia laktoferyny wynosiła 173,0 µg/mL (zakres 0,2 - 286,9 µg/mL), a w próbkach z ujemnym wynikiem na obecność toksyn mediana wynosiła 1,6 µg/mL (zakres 0,3 - 150,1 µg/mL).



Rycina 2. Stężenie kalprotektyny w próbkach kału pacjentów z dodatnim i ujemnym wynikiem na obecność toksyn A i/lub B *C. difficile*.

W próbkach z dodatnim wynikiem na obecność toksyn A i/lub B *C. difficile* mediana stężenia kalprotektyny wynosiła 318,5 mg/kg (zakres 12,8 - 786,8 mg/kg), a w próbkach z ujemnym wynikiem na obecność toksyn mediana wynosiła 248,96 mg/kg (zakres 111,9 - 641,1 mg/kg).

Z badanych próbek kału, wyhodowano 39 szczepów *C. difficile*, 24 zaklasyfikowano do PCR RT 027, po dwa szczepy do PCR RT 010 i 014. Rybotypów pozostałych 11 szczepów nie ustalono.

Ponadto wszystkie szczepy *C. difficile* wykazały wrażliwość na: metronidazol i wancomycynę (średnia geometryczna MIC wynosiła odpowiednio 0,62 i 0,22 µg/mL) oraz amoksacylinę z kwasem klawulanowym oraz piperacylinę z tazobaktamem (średnia geometryczna MIC wynosiła odpowiednio 0,22 i 2,3 µg/mL). Wszystkie szczepy były odporne na ciprofloksacynę (średnia geometryczna MIC - 29,28 µg/mL). Średnie geometryczne wartości MIC badanych szczepów *C. difficile* przedstawia Tabela I.

Tabela I. Porównanie średnich geometrycznych wartości MIC szczepów *C. difficile* o PCR rybotypie 027 ze szczepami o innych rybotypach, wyhodowanych z próbek kału pacjentów z biegunką poantybiotykową.

Rybotyp	027 n=24	inne niż 027 n=15	Ogółem n=39
Metronidazol [µg/mL]	0,74	0,48	0,62
Wankomycyna [µg/mL]	0,13	0,49	0,22
Moksifloksacyna [µg/mL]	32*	3,85	14,17
Ciprofloksacyna [µg/mL]	32	25,4	29,28
Rifampicyna [µg/mL]	0,02	0,005	0,01
Erytromycyna [µg/mL]	256*	12,46	80,04
Klindamycyna [µg/mL]	2,08	10,08	3,81
Benzylpenicylina [µg/mL]	0,4	1,28	0,62
Imipenem [µg/mL]	32*	9,26	19,86
Amoksacylina / Kwas klawulanowy [µg/mL]	0,11	0,62	0,22
Piperacylina / Tazobaktam [µg/mL]	1,36	5,34	2,3

* - podwyższone wartości średniej geometrycznej MIC szczepów *C. difficile* RT 027 w stosunku do innych rybotypów.

Dwa szczepy *C. difficile* PCR RT 027 (8,3%) wykazały równoczesną oporność na klindamycynę, erytromycynę, moksifloksacynę i rifampicynę - MDR (**multi drug resistance**); wśród pozostałych szczepów wielolekooporności nie obserwowano.

DYSKUSJA

Kał stanowi bardzo złożoną i heterogenną próbkę biologiczną, dlatego w diagnostyce CDI należy wykorzystywać dodatkowe biomarkery zabezpieczające niezawodność i powtarzalność wyników, jak również stabilne, niepodlegające działaniu enzymów i innych substancji biorących udziału w procesach trawiennych w jelitach (3, 6, 18). Laktoferyna i kalprotektyna są uwalniane w przewodzie pokarmowym w odpowiedzi na stan zapalny.

Laktoferyna, stabilna glikoproteina (78 kDa) wiąże żelazo (22). Opisano dodatnią korelację pomiędzy liczebnością leukocytów i obecnością toksyn *C. difficile*, dlatego ocena stężenia laktoferyny w kale wraz z obecnością toksyn może być przydatna w prognozowaniu nasilenia zakażenia i ustalenia odpowiedniego leczenia (8). Przydatność wykrywania laktoferyny w kale wykazali Chilton i wsp. (8) dowodząc, iż wzrost stężenia laktoferyny koreluje z nasileniem objawów i ciężkością CDI. Boone i wsp. (6) zaś wykazali większą śmiertelność pacjentów zakażonych hiperepidemicznym szczepem *C. difficile*, u których w kale stwierdzono toksyny A/B *C. difficile* i podwyższone wartości laktoferyny. Autorzy w ocenie rokowania pacjentów z podejrzeniem CDI proponują wzięcie pod uwagę obok kryteriów klinicznych, poziom biomarkerów zarówno oznaczonych w krwi jak i w kale, a także rybotyp szczepu *C. difficile* powodującego zakażenie.

Równie obiecującym markerem wskazującym na proces zapalny jest kalprotektyna - stabilne białko, wiążące Ca^{2+} oraz Zn^{2+} , które stanowi około 60% rozpuszczalnych białek cytozolu neutrofilii (22). Kalprotektyna jest proteiną należącą do rodziny białek S100 (dwie podjednostki S100A8 oraz S100A9 zwane MRP8/MRP14 oraz kalgranuliny A i B), które w swojej budowie posiadają charakterystyczne motywy typu „EF-hand”, czyli helisa-pętla-helisa (12, 19), dzięki czemu są zdolne do wiązania głównie jonów wapnia Ca^{2+} oraz Zn^{2+} (12, 19, 25, 28).

W przebiegu procesu zapalnego kalprotektyna spełnia różnorodne funkcje. Należy do cząsteczek DAMP (danger-associated molecular patterns) i jako alarmina wzmacnia odpowiedź nieswoistą, jest czynnikiem chemotaktycznym dla makrofagów i neutrofilii, wzmacnia ich kumulację w ognisku zapalenia, wzmacnia ekspresję receptorów scavenger (zmiataczy) makrofagów oraz integryn neutrofilii, co skutkuje wzmożoną fagocytozą. Jednocześnie kalprotektyna ma działanie regulatorowe, wyciszając odpowiedź immunologiczną poprzez osłabianie syntezy immunoglobulin przez limfocyty czy dezaktywację makrofagów (28). Wykazuje również bezpośrednio silne działanie przeciwbakteryjne i przeciwgrzybicze poprzez wiązanie jonów Ca^{2+} oraz Zn^{2+} , które są niezbędne drobnoustrojom do procesu wzrostu i funkcjonowania (25).

Kalprotektyna kałowa jest odporna na degradację proteolityczną, w kale można ją oznaczać w ciągu 7 dni po pobraniu, niezależnie od temperatury przechowywania, łącznie z zamrażaniem (20). Znalazła ona zastosowanie w diagnozowaniu chorób przewodu pokarmowego, głównie w różnicowaniu nieswoistych zapaleń jelita (IBD) od zespołu jelita drażliwego (IBS) oraz zmian związanych z infekcją *C. difficile*, jest rekomendowana przez NIH (National Institutes of Health) (20, 24).

Oznaczenie stężenia kalprotektyny ma zastosowanie w diagnostyce. Test ten jest stosowany jako prognostyczny w rozwoju ciężkiego CDI (15, 21) a także w prognozowaniu kolejnych nawrotów u osób z chorobą zapalną jelit (22). Wyższe stężenia kalprotektyny stwierdza się zwłaszcza u pacjentów z biegunką wywołaną hiperwirulentnym szczepem *C. difficile* PCR rybotypu 027 z wysoką leukocytozą, ogólnym pogorszeniem stanu zdrowia, wyższym indeksem SSI (*Severity Score Index for CDI*) (21, 24, 26).

W swoich badaniach Zackular i wsp. (29), wskazali na istotne znaczenie obecności kalprotektyny w kale w związku z jej funkcją polegającą na wiązaniu Zn^{2+} . Prowadząc badania skolonizowanych *C. difficile* myszy wykazali oni, że nadmierne spożywanie Zn^{2+} wiąże się ze zwiększonym stężeniem tego pierwiastka w tkance jelit i w kale. U myszy z dietą o wysokiej zawartości Zn^{2+} obserwowano mniejszą różnorodność mikrobioty w po-

równaniu z myszami stosującymi tradycyjną dietę lub dietę o niskiej zawartości Zn^{2+} . Ponadto u myszy z dietą bogatą w Zn^{2+} obserwowano zaostrenie choroby i co jest bardzo ważne nadmiar Zn^{2+} obniżał próg antybiotyków niszczących mikrobiotę jelitową i sprzyjających zakażeniu *C. difficile*. Więc zwiększenie stężenia Zn^{2+} nasila objawy CDI, a kalprotektyna poprzez wiązanie Zn^{2+} i ograniczenie jego dostępności sprzyja zwalczaniu *C. difficile*. Wskazuje to na ważną rolę czynników środowiskowych oraz składników odżywczych w przebiegu CDI. Zmiany w diecie i ograniczenie nadmiernego spożycia Zn^{2+} może okazać się skuteczne w zapobieganiu CDI u pacjentów wysokiego ryzyka a także w ograniczeniu zachorowalności na CDI.

Barbut i wsp. (4) wykazali, że stężenia laktoferyny i kalprotektyny są wyższe u pacjentów z CDI, zwłaszcza tych, u których wykryto toksynę w kale, sugerując korelację między stanem zapalnym jelit a obecnością wolnych toksyn *C. difficile* w kale. Natomiast u pacjentów zakażonych szczepem toksynotwórczym bez wykrywalnych wolnych toksyn w kale wysokie stężenie laktoferyny lub kalprotektyny może pomóc w podjęciu odpowiednich decyzji podczas terapii empirycznej (4). Nasze badania wykazały znamienne wyższe wartości laktoferyny ($p < 0.005$) u pacjentów zakażonych hiperepidemicznym szczepem z wykrywaniem w kale toksynami A/B *C. difficile* (24/33; 72,7%), w porównaniu z pacjentami zakażonymi *C. difficile*, u których nie wykrywa się w kale toksyn. Analogiczne wyniki otrzymaliśmy także we wcześniejszych badaniach (2). Nie było podobnej znamiennej zależności wobec kalprotektyny. *Whitehead* i wsp. (27) badając ponad 200 próbek kału pacjentów hospitalizowanych (120 z CDI i 99 zdrowych) zaobserwowali brak użyteczności analizy stężenia kalprotektyny w wykluczeniu CDI. Wykazali oni wysoką czułość testów u pacjentów z CDI przy równoczesnej niskiej swoistości, opisując wysokie wartości stężenia kalprotektyny także u pacjentów, u których wykluczono bakteryjne lub pasożytnicze podłoże biegunki.

Natomiast odmienne wnioski przedstawili *Kim* i wsp. (15), którzy porównali wyniki stężenia kalprotektyny 71 osób zdrowych z wynikami 80 pacjentów z CDI, w tym 30 ciężkich przypadków i 50 pacjentów z łagodnymi objawami zakażenia. Otrzymane wyniki potwierdzają, iż analizę stężenia kalprotektyny można skutecznie wykorzystać jako marker predykcyjny do oceny stopnia ciężkości CDI w celu odpowiedniego postępowania skutkującego poprawą stanu klinicznego pacjentów. Podobne wnioski przedstawili *Rao* i wsp. (23) analizując grupę 50-ciu pacjentów po 60 roku życia wykazując, iż rosnące stężenie kalprotektyny kałowej związane jest z wystąpieniem powikłań i nawrotów CDI u tych osób.

Tymczasem *Peretz* i wsp. (21) poddali analizie 29 próbek kału pacjentów z CDI. W badanej grupie u 7 pacjentów (~24%) potwierdzono obecność szczepu hiperepidemicznego *C. difficile* oraz znacząco wyższe stężenie kałowej kalprotektyny niż w próbkach kału pacjentów zakażonych innymi rybotypami *C. difficile*. Autorzy sugerują, że w rutynowej praktyce diagnostyka mikrobiologiczna opiera się na wynikach testów ELISA - bez identyfikacji rybotypów, tak więc podwyższone stężenie kałowej kalprotektyny może wskazywać na możliwość wystąpienia cięższego i bardziej skomplikowanego przebiegu choroby związanej z PCR rybotypem 027 i może wpływać na wybór empirycznej terapii CDI.

W naszym badaniu u pacjentów z CDI przeciętna wartość stężenia kałowej kalprotektyny (mediana, wartość powyżej i poniżej której znajdowała się jednakowa liczba obserwacji) ponad sześciokrotnie przewyższała wartość stężenia przyjętą jako wynik dodatni

(>50 mg/kg). Nie były to jednak wartości istotne statystycznie w porównaniu z pacjentami z ujemnym wynikiem na obecność toksyn A/B *C. difficile*, u kilku, z których stężenie kalprotektyny także przewyższało aż ~5-cio krotnie wartość stężenia przyjętą, jako wynik dodatni. Porównywalne wyniki do naszych uzyskali Swale i wsp. (24), którzy obserwowali istotny statystycznie ($p=0,02$) związek między stężeniem laktoferyny w kale a nasileniem objawów choroby, jednak nie odnotowali korelacji w przypadku stężenia kalprotektyny.

Badając lekowrażliwości szczepów *C. difficile* wyhodowanych z badanych próbek kału, stwierdziliśmy wrażliwość na aktualnie zalecane do leczenia CDI antybiotyki: metronidazol oraz wankomycynę. Wśród wyhodowanych 39 szczepów *C. difficile* wykazano jedynie 2 (należące do PCR RT 027), które *in vitro* charakteryzowały się opornością na co najmniej cztery grupy leków - MDR. Próbkę kału, z których wyhodowano te szczepy pochodziły od pacjentek hospitalizowanych w tym samym szpitalu. Ponadto pacjentki były w podeszłym wieku (83 i 90 lat) i prócz CDI odnotowano u nich szereg chorób współistniejących (w tym kardiologiczne), ostatecznie jednak tradycyjna terapia w obu przypadkach poskutkowała i nie obserwowano nawrotów choroby. W obu próbkach kału obserwowano dodatkowo znacznie podwyższone stężenie zarówno laktoferyny jak i kalprotektyny.

W naszym badaniu ważnym ograniczeniem była mała liczebność badanych próbek kału.

Podeszły wiek (>65 r. ż.), antybiotykoterapia, hospitalizacja i choroby współistniejące, to najczęstsze czynniki ryzyka CDI. Dlatego Kopylov i wsp. (16) sugerują, iż podwyższone stężenie kałowej laktoferyny i kalprotektyny może być wynikiem wielu chorób o zapalnym tle, ale jest szczególnie ważne w przypadku CDI, ponieważ grupę ryzyka stanowią pacjenci w podeszłym wieku z wieloma chorobami współistniejącymi (24).

WNIOSKI

Dla optymalizacji leczenia CDI precyzyjna i szybka diagnoza ma kluczowe znaczenie. Oznaczenie stężenia kalprotektyny i laktoferyny w kale służy do oszacowania zapalnego stanu jelit. Dalsze badania na większej grupie pacjentów z CDI będą przydatne aby wykazać ważną rolę parametrów stanu zapalnego kalprotektyny i laktoferyny w oszacowaniu ciężkości CDI i dalszego przebiegu zakażenia.

Praca została wykonana w ramach projektu: KNW-1-091/K/6/0 oraz KNW-1-039/K/7/0.

PIŚMIENNICTWO

1. Aptekorz M, Martirosian G. Diagnostyka mikrobiologiczna zakażeń *Clostridium difficile*. Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia 2017; 69: 177-85.
2. Aptekorz M, Szczegielniak A, Wiechula B i inni. Occurrence of *Clostridium difficile* ribotype 027 in hospitals of Silesia, Poland. Anaerobe 2017; 45: 106-13.
3. Archbald-Pannone LR. Quantitative fecal lactoferrin as a biomarker for severe *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients. J Geriatr Palliat Care 2014; 3.

4. Barbut F, Gouot C, Lapidus N i inni. Faecal lactoferrin and calprotectin in patients with *Clostridium difficile* infection: a case-control study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2017. doi: 10.1007/s10096-017-3080-y.
5. Bidet P, Lalande V, Salauze B i inni. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2000; 38: 2484-7.
6. Boone JH, DiPersio JR, Tan MJ i inni. Elevated lactoferrin is associated with moderate to severe *Clostridium difficile* disease, stool toxin, and 027 infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2013; 32: 1517-23.
7. Boone JH, Archbald-Pannone LR, Wickham KN i inni. Ribotype 027 *Clostridium difficile* infections with measurable stool toxin have increased lactoferrin and are associated with a higher mortality. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014; 33: 1045-51.
8. Chilton CH, Crowther GS, Spiewak K i inni. Potential of lactoferrin to prevent antibiotic-induced *Clostridium difficile* infection. J Antimicrob Chemother 2016; 71: 975-85.
9. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S i inni. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). Infect Control Hosp Epidemiol 2010; 31: 431-55.
10. Davies KA, Ashwin H, Longshaw CM i inni. Diversity of *Clostridium difficile* PCR ribotypes in Europe: results from the European, multicentre, prospective, biannual, point-prevalence study of *Clostridium difficile* infection in hospitalised patients with diarrhoea (EUCLID), 2012 and 2013. Euro Surveill 2016; 21. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.29.30294.
11. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. Clin Microbiol Infect 2014; 20: 1-26.
12. Donato R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. Biochim Biophys Acta 1999; 1450: 191-231.
13. Hensgens MP, Goorhuis A, Dekkers OM i inni. All-cause and disease-specific mortality in hospitalized patients with *Clostridium difficile* infection: a multicenter cohort study. Clin Infect Dis 2013; 56: 1108-16.
14. Kelly CP. Immune response to *Clostridium difficile* infection. Eur J Gastroenterol Hepatol 1996; 8: 1048-53.
15. Kim J, Kim H, Oh HJ i inni. Fecal Calprotectin Level Reflects the Severity of *Clostridium difficile* Infection. Ann Lab Med 2017; 37: 53-7.
16. Kopylov U, Rosenfeld G, Bressler B, Seidman E. Clinical utility of fecal biomarkers for the diagnosis and management of inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2014; 20: 742-56.
17. Larsen A, Hovdenak N, Karlsdottir A i inni. Faecal calprotectin and lactoferrin as markers of acute radiation proctitis: a pilot study of eight stool markers. Scand J Gastroenterol 2004; 39: 1113-8.
18. LaSala PR, Ekhmimi T, Hill AK i inni. Quantitative fecal lactoferrin in toxin-positive and toxin-negative *Clostridium difficile* specimens. J Clin Microbiol 2013; 51: 311-3.
19. Lewit-Bentley A, Réty S. EF-hand calcium-binding proteins. Curr Opin Struct Biol 2000; 10: 637-43.

20. Olender K, Bergmann K, Odrowąż-Sypniewska G. Kalprotektyna w kale jako marker zapalny w nieswoistych zapaleniach jelit. *Journal of Laboratory Diagnostics* 2012; 4: 433-9.
21. Peretz A, Tkhawkho L, Pastukh N i inni. Correlation between fecal calprotectin levels, disease severity and the hypervirulent ribotype 027 strain in patients with *Clostridium difficile* infection. *BMC Infect Dis* 2016; 16: 309.
22. Poullis A, Foster R, Northfield TC, Mendall MA. Review article: faecal markers in the assessment of activity in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 675-81.
23. Rao K, Santhosh K, Mogle JA i inni. Elevated fecal calprotectin associates with adverse outcomes from *Clostridium difficile* infection in older adults. *Infect Dis (Lond)* 2016; 48: 663-9.
24. Swale A, Miyajima F, Roberts P i inni. Calprotectin and lactoferrin faecal levels in patients with *Clostridium difficile* infection (CDI): a prospective cohort study. *PLoS One* 2014; 9: e106118.
25. Urban CF, Ermert D, Schmid M i inni. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000639.
26. Velazquez-Gomez I, Rocha-Rodriguez R, Toro DH i inni. A Severity Score Index for *Clostridium difficile* Infection. *Infect Dis Clin Pract* 2008; 16: 376-8.
27. Whitehead SJ, Shipman KE, Cooper M i inni. Is there any value in measuring faecal calprotectin in *Clostridium difficile* positive faecal samples? *J Med Microbiol* 2014; 63: 590-3.
28. Yui S, Nakatani Y, Mikami M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with a broad apoptosis-inducing activity. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 753-60.
29. Zackular JP, Moore JL, Jordan AT i inni. Dietary zinc alters the microbiota and decreases resistance to *Clostridium difficile* infection. *Nat Med*. 2016; 22: 1330-4.

Otrzymano: 22 XI 2017 r.

Adres Autora: 40-752 Katowice, ul. Medyków 18, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Wydziału Lekarskiego w Katowicach Śląskiego Uniwersytetu Medycznego

Oporność typu MLS_B u klinicznych izolatów *Bacteroides* i *Parabacteroides*

MLS_B resistance in clinical isolates of *Bacteroides* and *Parabacteroides*

Marta Kierzkowska^{1,2}, Anna Majewska^{1,2*}, Ksenia Szymanek-Majchrzak^{1,2},
Anna Sawicka-Grzelak^{1,2}, Andrzej Młynarczyk², Grażyna Młynarczyk^{1,2}

¹Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

²Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Szpital Kliniczny Dzieciątka Jezus w Warszawie

Zgodnie z rekomendacjami EUCAST pałeczki *Bacteroides* sp. fenotypowo wrażliwe na klindamycynę i jednocześnie z wartością MIC erytromycyny >32 mg/L należy raportować jako odporne na klindamycynę. W prowadzonym badaniu 42% izolatów prezentowało w/w profil. Wykazano jednak, że zaledwie 7,2% takich izolatów posiada geny *erm* związane z opornością typu MLS_B. W pozostałych przypadkach oporność na erytromycynę, ale nie na klindamycynę, może być spowodowana aktywnym wypompowywaniem leku z komórki przez pompy błonowe.

Słowa kluczowe: *Bacteroides* sp., beztlenowce, klindamycyna, MLS_B, *Parabacteroides* sp.

ABSTRACT

Introduction: The MLS_B resistance (to macrolides, lincosamides and streptogramin B) is associated with the presence of *erm* genes (*ermF*, *ermB*, *ermG*). The aim of the study was to check the presence of the mechanism MLS_B resistance in *Bacteroides* spp. and *Parabacteroides* spp. isolates originated from clinical specimens.

Methods: The study involved 200 clinical isolates collected from 190 patients hospitalized in the years 2007-2012. The mechanism of resistance was assessed using E-tests, test with two disks (clindamycin 15 µL, and erythromycin 2 µL) and then *erm* genes (*ermB*, *ermF*, *ermG*) have been detected.

Results: Overall 42% of the isolates tested was susceptible to clindamycin (MIC ≤ 4 mg/L) but resistant to erythromycin (MIC > 32 mg/L). According to EUCAST recommendations, such strains should be reported as resistant to clindamycin. However, in only 7.2% of them the *erm* genes (mainly *ermF*) were detected. Resistance to clindamycin was present in 31% of all tested isolates. Additionally, it was observed that the proportion of clindamycin resistant strains increased from 20% in 2007 to 40% in 2012.

Conclusions: In our investigations it was shown that the resistance to clindamycin of isolates of *Bacteroides* spp. and *Parabacteroides* spp. obtained from patients of Warsaw hospital has steadily increased. It is in accordance with studies of other European laboratories which show high levels of resistance to clindamycin. In our study, resistance was mainly detected in *B. ovatus*, *P. distasonis*, *B. uniformis*, and *B. fragilis*. The proportion of resistant *B. fragilis* increased more than twice (from 15% to 36.6%) during the period considered. The clindamycin MIC in each case had an extreme value of 256 mg/L. For this reason, empirical therapy should be always implemented on the basis of a clinical assessment of the course of infection and of the antimicrobial drug resistance pattern in the hospital and ward and then modified on the basis of the results of the drug susceptibility tests. Sensitivity to clindamycin should be routinely monitored in medical laboratories.

Key words: *Bacteroides* spp., anaerobes, clindamycin, MLS_B, *Parabacteroides* spp.

WSTĘP

Mechanizm oporności typu MLS_B (na makrolidy, linkozamidy i streptograminy B) związany jest z obecnością genów *erm* (*ermF*, *ermB*, *ermG*) kodujących adenilo-N-metylotransferazy. Metylazy *erm* powodują metylację pojedynczej adeniny w podjednostce 23S rRNA rybosomu będącym wspólnym miejscem docelowym wymienionych antybiotyków. Oporność tego typu polega zatem na zablokowaniu syntezy bakteryjnych białek i określana jest jako oporność krzyżowa typu MLS_B. Ekspresja oporności może być konstytutywna lub indukowalna (1, 8, 13). Indukcyjny mechanizm oporności występuje, gdy produkcja metylaz jest wynikiem indukcji translacji mRNA przepisanej z genów *erm* przez 14- lub 15-członowe makrolidy, takie jak erytromycyna, azytromycyna, klarytromycyna. Klindamycyna nie jest induktorem tego mechanizmu oporności, jednak jej stosowanie może prowadzić do niepowodzenia terapeutycznego wskutek selekcji mutantów z konstytutywnym mechanizmem oporności typu MLS_B. Ekspresja genów *erm* może być aktywowana w wyniku wbudowania sekwencji insercyjnej w pobliżu początkowej sekwencji genu *erm*, np. *ermF* przez IS4351 (6, 19).

Oporność na erytromycynę, ale nie na klindamycynę, może być spowodowana mechanizmem aktywnego wypompowywania leku z komórki przez pompy błonowe ABC lub MFS (np. białka MefA, MsrSA) (1, 8, 19). Gen *msrSA* został opisany po raz pierwszy u *Staphylococcus aureus*, ale jest również wykrywany u szczepów *Bacteroides* sp. (15, 19).

Należąca do linkozamidów klindamycyna jest antybiotykiem powszechnie stosowanym w szpitalnej i ambulatoryjnej profilaktyce antybiotykowej, również w leczeniu zakażeń wywołanych przez bakterie beztlenowe. Ze względu na swoje korzystne parametry farmakokinetyczne stosowana jest zwłaszcza w chirurgii urazowo-ortopedycznej (3, 9). Współcześnie, istotnym problemem jest oporność pałeczek *Bacteroides* sp. i *Parabacteroides* sp. na klindamycynę w wyniku jej częstego stosowania. W ciągu ostatnich kilku dekad odsetek szczepów opornych izolowanych od chorych systematycznie wzrasta w Europie i dotyczy około 30% izolatów *Bacteroides* sp. (2, 10, 14, 15, 16). Uznaje się, że oporność ta jest spowodowana obecnością i określonym poziomem ekspresji fenotypowej głównie genu *ermF* (6).

Celem badania była analiza szczepów *Bacteroides* sp. i *Parabacteroides* sp. izolowanych z próbek materiału klinicznego pod kątem występowania oporności na klindamycynę, związanej głównie z mechanizmem oporności typu MLS_B.

MATERIAŁ I METODY

Badane szczepy: Do badań zakwalifikowano 200 izolatów: *B. fragilis* (111), *B. thetaiotaomicron* (38), *B. ovatus* (12), *B. vulgatus* (11), *B. uniformis* (7), *B. stercoris* (2), *B. caccae* (1) oraz *Parabacteroides distasonis* (18). Szczepy te pochodziły ze 191 próbek materiału klinicznego, pobranych od 190 pacjentów hospitalizowanych w różnych klinikach SKDJ w latach 2007-2012. Wyhodowane zostały z wymazów z ran/ropni, płynów z jamy brzusznej, wymazów z kanału szyjki macicy, fragmentów tkanek miękkich, krwi, żółci.

Izolacja i identyfikacja. Próbkę materiału klinicznego, w trybie rutynowej diagnostyki mikrobiologicznej, posiewano na podłoże Schaedler Agar (SCS, bioMérieux, Francja) z 5% krwią baranią i witaminą K₁ i inkubowano w temperaturze 37°C w anaerostatach (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂). Okres inkubacji trwał 48 godzin. Po tym czasie dokonywano izolacji kolonii na podłoże SCS i jednocześnie na podłoże Columbia Agar (COS) z dodatkiem 5% odwłóknionej krwi baraniej (bioMérieux) w celu przeprowadzenia kontroli wzrostu bakterii w warunkach tlenowych. Identyfikacji izolatów dokonano przy użyciu spektrometrii masowej MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry) w systemie VITEK MS (bioMérieux).

Oznaczenie lekowrażliwości. Kolonie zawieszano w podłożu Brucella Broth (Graso Biotech, Polska) do uzyskania zmętnienia 1 w skali McFarlanda. Zawiesinę rozproszano na podłożu Brucella Agar z krwią (bioMérieux). Następnie układano paski E-test impregnowane gradientem stężeń: erytromycyny (EM; 0,016-256 mg/L) i klindamycyny (CM; 0,016-256 mg/L). Odczytu dokonywano po 48-godzinnej inkubacji w atmosferze beztlenowej, w temp. 35°C.

W celu wykrycia oporności typu MLS_B zastosowano krążki z erytromycyną (15 µl) i klindamycyną (2 µl), które umieszczano (w odległości 15 mm od krawędzi krążków) na podłożu Brucella Agar (zawiesina bakteryjna o zmętnieniu 1,0 McFarlanda). Podłoża inkubowano w atmosferze beztlenowej, w temp. 35°C przez 24 godz. Interpretacji wyniku dokonywano zgodnie z zaleceniami Europejskiego Komitetu ds. Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST) (7).

W dalszym etapie badań wykrywano, związane z tą opornością, geny *erm*: *ermF*, *ermB*, *ermG*. Przeprowadzono reakcje PCR na matrycach DNA 200 izolatów klinicznych z zastosowaniem par starterów dla każdego z 3 genów kodujących oporność na klindamycynę (*ermF*- GGACCTACCTCATAGACAAG, CGGGTCAGCACTTTACTATTG, *ermB*-CTATCTGATTGTTGAAGAAGGATT, GTTACTCTTGGTTTAGGATGAAA, *ermG*-ACATTTCTAGCCACAATC, CGCTATGTTTAAACAAGC) (5, 12, 18). Wszystkie startery zsyntetyzowano w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB, PAN w Warszawie.

WYNIKI

W prowadzonym badaniu fenotypowa oporność na klindamycynę ($MIC > 4$ mg/L) występowała u 62 (31%) badanych izolatów; 75% izolatów zidentyfikowanych jako *B. ovatus*, 50% jako *P. distasonis* oraz 42,86% jako *B. uniformis* charakteryzowała się opornością na ten antybiotyk (Tabela I). Jednocześnie zaobserwowano, że odsetek szczepów opornych na klindamycynę zwiększył się z ok. 20% w 2007 do ok. 40% w 2012 roku.

Tabela I. Zakresy wartości MIC klindamycyny, MIC_{50} , MIC_{90} dla *Bacteroides* spp. i *Parabacteroides* spp. oraz odsetek szczepów opornych na klindamycynę (%R).

Gatunek (n)	klindamycyna			
	zakres MIC	MIC_{50}	MIC_{90}	% R
<i>B. fragilis</i> group (182)	0,016-256	1	256	29,12
<i>B. fragilis</i> (111)	0,016-256	0,5	256	22,52
<i>B. thetaiotaomicron</i> (38)	0,25-256	2	256	26,32
<i>B. ovatus</i> (12)	0,125-256	256	256	75
<i>B. vulgatus</i> (11)	0,016-256	0,5	256	27,27
<i>B. uniformis</i> (7)	0,016-256	0,5	256	42,86
<i>B. stercoris</i> (2)	256-256	256	256	100
<i>B. caccae</i> (1)	256	256	256	100
<i>P. distasonis</i> (18)	0,75-256	4	256	50
RAZEM (200)	0,016-256	1,5	256	31

Należy zauważyć, że zgodnie z rekomendacjami EUCAST, jeśli w rutynowym badaniu wartość MIC erytromycyny wynosi > 32 mg/L dla pałeczek *Bacteroides* sp. oraz jednocześnie występuje fenotypowa wrażliwość na klindamycynę, szczepy takie należy raportować jako oporne na klindamycynę. W prowadzonym badaniu taka sytuacja dotyczyła 84 (42%) badanych izolatów (Tabela II). Wykonując badania molekularne gen *ermF* wykryto u 62 izolatów, gen *ermB* u jednego - *B. caccae* (łącznie u 31%; Tabela III), wśród nich 6 (9,7%) izolatów było opornych na erytromycynę, a wrażliwych na klindamycynę (Tabela II).

Występowanie oporności indukowanej ($iMLS_B$) w tych szczepach badano wykonując test dyfuzji z krążkami nasączonymi erytromycyną i klindamycyną. Pomimo, że metoda dyfuzyjno-krążkowa nie jest zalecana do oznaczania lekowrażliwości u bakterii beztlenowych, uzyskano charakterystyczną strefę zahamowania wzrostu od strony krążka z erytromycyną (w kształcie litery D) potwierdzającą występowanie mechanizmu $iMLS_B$ u 5 szczepów *Bacteroides* sp. i u jednego *P. distasonis*.

Genów *erm* nie wykryto u 78 izolatów opornych *in vitro* na erytromycynę, a wrażliwych na klindamycynę. Oporność na erytromycynę, ale nie na klindamycynę może być spowodowana mechanizmem aktywnego wypompowywania leku z komórki przez białka transportowe w błonie komórkowej (produkty genów *mef* lub *msrSA*).

Tabela II. Występowanie genów *ermF*, wśród *Bacteroides* spp. i *P. distasonis* wrażliwych na klindamycynę (MIC ≤ 4 mg/L) i opornych na erytromycynę (MIC > 32 mg/L).

Gatunek (n)	CLI	ERY	geny	
	MIC ≤ 4mg/L	MIC > 32mg/L	<i>ermF</i> (+)	<i>ermF</i> (-)
<i>B. fragilis</i> group (182)	129	78	5	73
<i>B. fragilis</i> (111)	86	66	3	63
<i>B. thetaiotaomicron</i> (38)	28	11	2	9
<i>B. ovatus</i> (12)	3	1	0	1
<i>B. vulgatus</i> (11)	8	0	0	0
<i>B. uniformis</i> (7)	4	0	0	0
<i>B. stercoris</i> (2)	0	0	0	0
<i>B. caccae</i> (1)	0	0	0	0
<i>P. distasonis</i> (18)	9	6	1	5
RAZEM (200)	138	84	6	78

CLI - klindamycyna, ERY – erytromycyna, *ermF* (+) - obecność genu *ermF*, *ermF* (-) - brak genu *ermF*

Tabela III. Występowanie genów *erm* u szczepów *Bacteroides* spp. i *Parabacteroides* spp. izolowanych z próbek materiałów klinicznych.

Gatunek (n)	geny	
	<i>ermF</i>	<i>ermB</i>
	n (%)	n (%)
<i>B. fragilis</i> group (182)	53 (29,12)	1 (0,55)
<i>B. fragilis</i> (111)	28 (25,23)	0 (0)
<i>B. thetaiotaomicron</i> (38)	9 (23,68)	0 (0)
<i>B. ovatus</i> (12)	8 (66,67)	0 (0)
<i>B. vulgatus</i> (11)	4 (36,36)	0 (0)
<i>B. uniformis</i> (7)	4 (57,14)	0 (0)
<i>B. stercoris</i> (2)	0 (0)	0 (0)
<i>B. caccae</i> (1)	0 (0)	1 (100)
<i>P. distasonis</i> (18)	9 (50)	0 (0)
RAZEM (200)	62 (31)	1 (0,5)

W przypadku 51 (82,3%) izolatów, u których stwierdzono obecność genu *ermF* i jednego izolatu *B. caccae* z genem *ermB* zaobserwowano oporność fenotypową na erytromycynę i klindamycynę. Szczepy te cechuje oporność konstytutywna (cMLS_B). Natomiast u 5 (8,1%) izolatów, pomimo detekcji genu *ermF* wykazano wrażliwość na erytromycynę i klindamycynę. U 10 izolatów występowała oporność fenotypowa na erytromycynę i klindamycynę, przy braku genu *erm*. Pozostałe 49 szczepy (24,5%) były wrażliwe na te antybiotyki i nie posiadały genów oporności *erm*. W żadnym izolacie nie wykryto genu *ermG*.

DYSKUSJA

Zasadność oznaczania wrażliwości na antybiotyki bakterii bezwzględnie beztlenowych była przedmiotem dyskusji mikrobiologów i lekarzy przez wiele lat (4, 14). Badanie mikrobiologiczne w kierunku beztlenowców może trwać nawet kilka dni, więc w przypadku podejrzenia zakażenia o tej etiologii istnieje konieczność zastosowania leczenia empirycznego, lekami z wyboru są najczęściej metronidazol i klindamycyna.

W wyniku powszechnego stosowania klindamycyny, coraz częściej u pałeczek *Bacteroides* sp. i *Parabacteroides* sp. stwierdza się brak wrażliwości na ten antybiotyk (2, 14, 16). W wieloośrodkowych badaniach prowadzonych w laboratoriach europejskich i opublikowanych przez Nagy i wsp. (15) wykazano wysoki poziom oporności na klindamycynę (28,5% - 60%). Trend ten potwierdzają wyniki badań prowadzonych w Holandii i w Belgii (20, 21). Zaprezentowane wyniki wskazują, że oporność na klindamycynę występuje u 31% izolatów, które wyizolowano od pacjentów hospitalizowanych na oddziałach warszawskiego szpitala. Stosowanie klindamycyny w leczeniu empirycznym zakażeń (szczególnie w obrębie jamy brzusznej lub na oddziałach urazowo-ortopedycznych) może prowadzić zatem do braku sukcesu terapeutycznego (11, 17, 21). Racjonalna terapia empiryczna powinna być wdrożona na podstawie klinicznej oceny przebiegu zakażenia oraz wzoru oporności na leki przeciwbakteryjne w szpitalu i oddziale oraz modyfikowana na podstawie wyniku lekowrażliwości (11, 16).

W rutynowej diagnostyce mikrobiologicznej, zgodnie z rekomendacjami EUCAST w przypadku otrzymania wartości MIC erytromycyny >32 mg/L dla pałeczek *Bacteroides* sp. oraz jednocześnie wrażliwości na klindamycynę, szczepy należy raportować jako odporne na klindamycynę (15). Eitel i wsp. (6) wykazali, że wśród 161 izolatów *Bacteroides* sp. 24,8% prezentowało fenotypową oporność na klindamycynę. Geny związane z opornością tj. *ermF*, *mefA*, *ermG*, *msrSA* i *ermB* były obecne u odpowiednio: 24,2%, 12,4%, 5,6%, 5,6% oraz 0,6% spośród wszystkich badanych izolatów *Bacteroides* sp. oraz u odpowiednio: 75,0%, 27,5%, 22,5%, 22,5% oraz 2,5% izolatów *Bacteroides* sp. opornych na klindamycynę (6). W prezentowanej pracy wykrywano geny *ermF*, *ermB* i *ermG*. Gen *ermF* obecny był u 31%, *ermB* u 0,5% badanych izolatów, *ermG* nie wykryto w ogóle. Z kolei częstość występowania *ermF* i *ermB* wśród izolatów opornych na klindamycynę ($\text{MIC} > 4$ mg/L) wynosiła odpowiednio 82,26% i 1,61%.

Z doświadczeń innych badaczy wiadomo, że gen *ermF* jest najczęściej występującym genem oporności na klindamycynę u pałeczek z rodzaju *Bacteroides* (15). Wyniki prezentowane przez Eitel i wsp. (6) wskazują, że był on obecny u 74,2% z 31 opornych na klindamycynę izolatów *B. fragilis* i u 77,8% z 9 opornych izolatów należących do gatunków innych niż *B. fragilis* (non-*B. fragilis*; NFB). W prowadzonym badaniu otrzymano podobne wyniki, gen *ermF* wykryto u 81,13% izolatów *B. fragilis* i u 74,07% NFB opornych na klindamycynę. Wykazano również obecność genu *ermF* u 10 izolatów, które charakteryzowały się wrażliwością na klindamycynę ($\text{MIC} \leq 4$ mg/L), co związane jest z ekspresją genu na niskim poziomie.

Podsumowując, można stwierdzić, że szczepy wrażliwe na klindamycynę albo nie posiadają jakichkolwiek genów oporności albo mogą mieć gen *ermF*, którego ekspresja się nie ujawnia. Głównym czynnikiem oporności na klindamycynę może być sam gen *ermF* lub w połączeniu z innymi genami (*ermG*, *mefA* i *msrSA*) znajdującymi się na transpozonie CTnGERM1 (6).

PIŚMIENNICTWO

1. Abbas A, Srivastava P, Nirwan PS. Prevalence of MLS_B resistance and observation of *ermA* & *ermC* genes at a tertiary care hospital. JCDR 2015; 9: 8-10.
2. Brook I, Wexler HM, Goldstein EJ. Antianaerobic antimicrobials: spectrum and susceptibility testing. Clin Microbiol Rev 2013; 26:526-46.
3. Brook I. Spectrum and treatment of anaerobic infections. J Infect Chemother 2016; 22:1-13.
4. Boyanova L, Kolarov R, Mitov I. Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. Anaerobe 2015; 31: 4-10.
5. Boente RF, Ferreira LQ, Falcão LS i inni. Detection of resistance genes and susceptibility patterns in *Bacteroides* and *Parabacteroides* strains. Anaerobe 2010;16: 190-4.
6. Eitel Z, Sóki J, Urbán E i inni. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. Anaerobe 2013; 21: 43-9.
7. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints (dostęp 02.08.2017).
8. Kaczmarek A, Budzyńska A, Gospodarek E. Występowanie w latach 2002-2004 szczepów *Staphylococcus aureus* z fenotypem oporności MLSB w próbkach materiału klinicznego. Med Dośw Mikrobiol 2006; 58: 103-11.
9. Kierzkowska M, Majewska A, Sawicka-Grzelak A i inni. Specyfika zakażeń bakteriami beztlenowymi na oddziałach chirurgicznych i ortopedycznych. Med Dośw Mikrobiol 2012; 64: 29-34
10. Kierzkowska M, Majewska A, Sawicka-Grzelak A i inni. Antibiotic resistance profiles of strictly anaerobic Gram-negative *Bacteroides* spp. and *Parabacteroides* spp. bacilli isolated from infected inpatients on surgical wards. J Glob Antimicrob Resist 2016; 7: 128-9.
11. Kierzkowska M, Pedzisz P, Babiak I i inni. Orthopedic infections caused by obligatory anaerobic Gram-negative rods: report of two cases. Med Microbiol Immunol 2017; 206:363-6.
12. Martineau F, Picard FJ, Grenier L i inni. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. The ESPRIT Trial. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 527-34.
13. Reig M, Galan JC, Baquero F, Perez-Diaz JC. Macrolide Resistance in *Peptostreptococcus* spp. mediated by *ermTR*: possible source of macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in *Streptococcus pyogenes*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 630-2.
14. Nagy E. Anaerobic infections: update on treatment considerations. Drugs 2010; 70: 841-58.
15. Nagy E, Urbán E, Nord CE; ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 371-9.

16. Schuetz AN. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. Clin Infect Dis 2014; 59: 698-705.
17. Sheikh SO, Jabeen K, Qaiser S i inni. High rate of non-susceptibility to metronidazole and clindamycin in anaerobic isolates: Data from a clinical laboratory from Karachi, Pakistan. Anaerobe 2015; 33: 132-6.
18. Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. Appl Environ Microbiol 2001; 67: 561-8.
19. Słoki J, Hedberg M, Patrick S i inni. Emergence and evolution of an international cluster of MDR *Bacteroides fragilis* isolates. J Antimicrob Chemother 2016; 71: 2441-8.
20. Veloo AC, van Winkelhoff AJ. Antibiotic susceptibility profiles of anaerobic pathogens in The Netherlands. Anaerobe 2015; 31: 19-24.
21. Wybo I, Van den Bossche D, Soetens O i inni. Fourth Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. J Antimicrob Chemother 2014; 69: 155-61.

Otrzymano: 13 XI 2017 r.

Adres Autora: 02-004 Warszawa, ul. Chałubińskiego 5, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej
Warszawski Uniwersytet Medyczny
e-mail: anna.majewska@wum.edu.pl

Charakterystyka klinicznych izolatów *Pseudomonas aeruginosa*
pod kątem tworzenia biofilmu, lekooporności oraz występowania genów
dla toksyn wydzielanych w systemie sekrecji typu 3.

Characteristic of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* regarding
biofilm formation, drug resistance and genes for toxins secreted
by the type 3 secretion system

Monika Pobiega^{1*}, Agnieszka Chmielarczyk^{1*}, Monika Pomorska-Wesołowska²,
Dorota Romaniszyn¹, Piotr B. Heczko¹, Joanna Koziol³, Jadwiga Wojkowska-Mach¹

¹Department of Microbiology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

²Department of Microbiology, Analytical and Microbiological Laboratory of Ruda Slaska
KORLAB NZOZ, Ruda Slaska, Poland

³Institute of Dentistry, Department of Dental Prophylaxis and Experimental Dentistry,
Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

Celem badania była analiza zdolności tworzenia biofilmu w kontekście lekooporności i wirulencji szczepów *P.aeruginosa* izolowanych z układu moczowego, krwi i zakażeń dolnych dróg oddechowych od pacjentów ambulatoryjnych oraz hospitalizowanych w szpitalach z południowej Polski. Tworzenie biofilmu przez poszczególne izolaty badano z wykorzystaniem metody z fioletem krystalicznym. Obecność genów kodujących toksyny wydzielane w systemie sekrecji typu 3 badano metodą łańcuchowej polimerazy (PCR). Lekooporność testowano zgodnie z wytycznymi EUCAST. Wśród 219 izolatów *P.aeruginosa* 46 zostało scharakteryzowanych jako szczepy wielolekooporne (MDR), a 26 jako szczepy o rozszerzonej oporności (XDR). Liczba szczepów produkujących biofilm odpowiedzialnych za zakażenia występujące u pacjentów hospitalizowanych (szczególnie na oddziałach intensywnej terapii) była dwukrotnie wyższa niż szczepów nie tworzących biofilmu (odds ratio 0.5, 95%CI 0.31–0.97). Nie wykazano statystycznie znaczących różnic pomiędzy częstością występowania szczepów silniej tworzących biofilm, a poziomem ich lekooporności.

Słowa kluczowe: *Pseudomonas aeruginosa*, system wydzielania typu 3, lekooporność, biofilm, Polska

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to analyze biofilm production in the context of antimicrobial resistance and virulence in *P. aeruginosa* (PA) isolates from hospitalized and non-hospitalized patients with urinary tract infections, bloodstream infections, or pneumonia in southern Poland.

Methods: We screened biofilm formation in the isolates using crystal violet staining. Strains were tested for antimicrobial susceptibility by disc diffusion method according to EUCAST guidelines. The presence of genes encoding the toxins secreted by the type III secretion system (T3SS) were detected by PCR method.

Results: Altogether, 216 isolates were investigated, 109 of which came from hospitalized patients. The number of biofilm-producing strains responsible for infections in the hospitalized patients was twice as high as the non-biofilm-producers (odds ratio 0.5, 95% CI 0.31–0.97). In the samples from intensive care units (ICUs), the biofilm-producing strains caused more infections than those lacking biofilm production (ICU vs. others OR 0.4 95% CI 0.19–0.78). Forty-six isolates contained multidrug resistant PA and 26 contained extensively-drug resistant PA. No statistically significant differences were observed in the frequency of strains resistant to particular antimicrobials or bearing T3SS proteins between the male and female patients, as well as between the various biofilm producer categories.

Conclusions: Most of the PA strains were able to form biofilms on abiotic surfaces, there was no difference in the frequency of biofilm producers among the strains that exhibited different levels of antimicrobial resistance.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, type 3 secretion system, drug resistance, biofilm, Poland

Pseudomonas aeruginosa (PA) is one of the most important Gram-negative bacteria and one of the major pathogens responsible for a wide variety of severe nosocomial and community-acquired infections. According to the European Centre for Disease Prevention and Control (2), PA was one of the microorganisms most frequently isolated from hospital-acquired infections (HAIs) in 2014, especially from intensive care unit (ICU)-acquired infections, with bloodstream infections (BSIs) and urinary tract infections (UTIs) accounting for 8.2% and 14.1%, respectively. In adult patients in Poland, the prevalence of PA pneumonia (PNU) was 8.5%, while the prevalence of BSIs and UTIs was 0.7%, and 5.0%, respectively (4, 18). In children, the prevalence of PA in urinary tract infections was low at 2.1%, while in children <5 years of age it was 3.0% (17).

In modern medicine, acute infection such as BSIs, UTIs and PNU are often associated with medical devices such as tubes or catheters. The bacteria on these abiotic surfaces can often readily adaptive to a variety of niches, and some, like PA are capable of biofilm formation.

PA produces a large number of virulence factors and many of these factors are regulated by quorum sensing (21). An important feature of PA virulence is its type III secretion system (T3SS) (12). T3SS operation has been likened to a molecular syringe that injects bacterial effector proteins into host cells. PA has five effector proteins, namely ExoS, ExoT, ExoU, ExoY and FlhC, and these protect the bacterium against phagocytosis, and also affect tissue invasion and systemic spread as well as modulating the inflammatory response. T3SS gene

expression is controlled by intrinsic and extrinsic regulatory mechanisms (6, 14). Global extrinsic regulation of T3SS gene expression is made via the Vfr (Virulence factor regulator) cAMP-dependent regulator. The role of T3SS in PA is well-established within the context of the acute infection, sepsis, and high mortality caused by this bacterium (10, 20). The change in growth conditions that occur during bacterial transition from an acute to chronic infection state correlates with alternations in PA behavior including increased antibiotic tolerance and the biofilm mode of growth switching (15). Biofilm formation is subject to a regulatory system involving the RetS and LadS sensor kinases. Both kinases have opposite effects on GacA system activation, a process that regulates biofilm formation through the control of polysaccharides as the key components of the biofilm matrix. Inverse regulation by RetS and LadS implies that T3SS gene expression and biofilm formation are considered as opposite events. However, it is now thought that such a model is an over-simplification and expression of T3SS proteins is possible during biofilm growth (6, 15). It has also been shown that during infections where biofilm is formed, antimicrobial resistance in the bacterium is an important feature, and such infections are persistent and difficult to eradicate (7).

The aim of this laboratory-based study was to analyze biofilm production in the context of antimicrobial resistance and the profile of virulence genes of *P. aeruginosa* strains isolated from different sites of infection in hospitalized and non-hospitalized patients in southern Poland.

MATERIALS AND METHODS

Ethics. This work was approved by the Bioethics Committee of Jagiellonian University Medical College (No. KBET/312/B/2012 and KBET/362/B/2012). All data were anonymized prior to conducting the analysis.

Samples. Non-repetitive samples from UTIs, BSIs, and patients with PNU were collected from hospitalized patients (12 hospitals), long-term care facility residents, and non-hospitalized patients (outpatients, diagnosed with infections, but treated in ambulatory care, not in hospital) in southern Poland. Samples were collected in collaboration with two microbiological laboratories: KORLAB NZOZ, which is located in Ruda Śląska, Poland, and the microbiological laboratory at St. Barbara's Regional Hospital in Sosnowiec, Poland, between 1 January 2013 and 31 December 2013. Relevant patient information such as age, gender, and whether a hospital, ICU, or home care was the place of treatment was collected. Patients with PA infections (inclusion criteria) were defined according to the diagnosis of the physicians.

DNA extraction and polymerase chain reactions (PCRs). DNA templates were extracted from liquid cultures of tryptic soy broth (BioCORP, Poland) grown at 37°C for 18 h using a Genomic Mini kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland), according to the manufacturer's instructions. Isolates were screened for the presence of the major effector proteins genes of the T3SS (*exoS*, *exoT*, *exoU*, *exoY*). PCR analysis was performed using primers based on the same sequences and reaction conditions described in a previously published method (1). PCR Master Mix (2X) (A&A Biotechnology, Poland) was used for the PCRs. PCR products, separated on 1.5% agarose gels for 60 min at 90V, were stained with ethidium bromide (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) and detected using ultraviolet trans-illumination.

Antimicrobial susceptibility testing. Antimicrobial susceptibility testing of the strains was performed as described previously (18), with Mueller-Hinton agar plates, and following the current guidelines of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing for the disk diffusion method (clinical breakpoint table v.3.1; http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/, accessed 5.06.2013). All disks were obtained from Oxoid (Basingstoke, UK). Multidrug-resistant (MDR) strains were defined as strains not susceptible to one antimicrobial in at least three different antimicrobial classes, and extensively drug resistant (XDR) strains were defined as strains susceptible to no more than two antimicrobial classes (13).

To detect metallo- β -lactamases (MBL, strains resistant/intermediate to imipenem/meropenem and resistant to ticarcillin/clavulanate), the disc method where ceftazidime (30 μ g) and imipenem (10 μ g) were placed 20 mm apart from the disc area with EDTA (10 μ l 0.5M EDTA, pH 7.3–7.5) was used. EDTA is an inhibitor of MBLs, and the test is considered to be positive if the inhibition zone around the disc with ceftazidime and/or imipenem is enhanced (11).

Biofilm screening. Biofilm formation in the isolates was screened using the method of O'Toole with crystal violet staining (16). The strains were grown in M63 minimal medium containing 13.6 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, supplemented with 0.2% glucose and 0.5% casein (Oxoid, Basingstoke, UK), and the optical density (OD) of each strain was measured at 630 nm. Biofilm assays were performed in triplicate. Uninoculated M63 medium (Amresco, USA) with casein (Oxoid) was used as a negative control. The OD cut-off (OD_c) was defined as the mean OD value of the negative control. Based on the OD value, the strains were classified as follows: not biofilm producers (OD < OD_c), weak biofilm producers (OD_c < OD < 2xOD_c), moderate biofilm producers (2xOD_c < OD < 4xOD_c) or strong biofilm producers (4xOD_c < OD), according to the description of Borges et al. (3).

Statistics. Statistical analyses were performed using Statsoft Statistical software (version 10, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). The distributions of the continuous variables were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. Because the values of the variables tested did not follow a normal distribution, the data, which we summarised as median, 25th (Q1), and 75th (Q3) percentile values, were tested using the nonparametric Mann-Whitney U test. For dichotomous variables, a Chi-square test was used for expected frequencies of ≤ 10 , a Chi-square test with Yates' correction was used for expected frequencies between 5 and 10, and a Chi-square test with confirmation by Fisher's exact test was used for expected frequencies of ≤ 5 . A *P*-value of < 0.05 was considered to indicate a statistically significant result.

RESULTS

Altogether, 216 strains were studied and 109 of them were isolated from hospitalized patients. Sixty-nine percent of the strains came from males and the median patient age was 64 (Quartile 1: 47; Quartile 3: 72), although 26 specimens came from under 17 year-olds. 148 of the isolates came from UTIs, 7 from BSIs and 61 from people with PNU. ICUs were responsible for 39 diagnosed infection cases (18.1% of all the PA infections that were studied), including 5 cases of BSI (71.4% of all BSIs), 25 cases of PNU (41.0%) and 9 UTI cases (6.1%).

Twenty six isolates were considered to be extensively drug-resistant, while 46 were multidrug resistant. All the strains isolated from BSIs ($n=7$) were MDR ($n=1$) or XDR

(n=6) strains. Strains isolated from UTI cases were 50% less drug-resistant (MDR and XDR vs. others) than the strains isolated from other cases (OR 0.4; 95%CI 0.23-0.76). Drug-resistant strains (XDR and MDR) were not common among the ICU and non-ICU hospitalized patients, or among patients with PNU. In the non-hospitalized patients, the number of drug-resistant strains (MDR and XDR) was almost two times lower than in the hospitalized patients (ICU and non-ICU together) (OR 0.5; 95% CI 0.28-1.01). Twenty-one strains were able to produce MBLs.

Among the isolates, 67% were classified as moderate or strong biofilm producers. The number of biofilm-producing strains responsible for infections in the hospitalized patients was two times higher than the non-biofilm-producers (OR 0.5, 95% CI 0.31-0.97). In the samples from ICUs, the biofilm-producing strains caused half of the infections of the biofilm-producing strains from non-ICU patients and from non-hospitalized patients together (ICU vs. others OR 0.4 95% CI 0.19-0.78) (Table 1).

Table I. Characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Strains were classified as follows: no biofilm production (OD<ODc), weak production (ODc<OD<2xODc), moderate production (2xODc<OD<4xODc) or strong biofilm production (4xODc<OD), according to Borges et al (8).

	Biofilm formation level		OR	95%CI	p-value
	Moderate or strong*, N=145	Weaker or absent*, N=71			
Patient age, median; 1Q, 3Q (year)	63; 51-72	64; 43-75	n/a		0,7
Patient gender, male (n; %)	93 (64.1%)	55 (77.5%)	0.5	0.27-0.99	0.048
Hospitalized patients(n; %)	66 (45.5%)	43 (60.6%)	0.5	0.31-0.97	0.017
ICU patients(n; %)	19 (13.1%)	20 (28.2%)	0.4	0.19-0.78	0.017
Type of infection (n; %)					
Pneumonia	42(29.0%)	19(26.8%)	1.1	0.59-2.11	0.8
Bloodstream infections	4(2.8%)	3 (4.2%)	0.6	0.14 -2.95	
Urinary tract infections	99(68.3%)	49 (69%)	1.0	0.52-1.78	
MBL(n; %)	11(7.6%)	10 (14.1%)	0.5	0.21-1.24	0.2
XDR or MDR (n; %)	44 (30.3%)	28 (39.4%)	0.7	0.37-1.21	0.2
Colistin resistance, median; 1Q, 3Q (MIC)	0.5; 0.4-1	0.5; 0.4-1	n/a		0.8
Virulence factor (n; %)					
exoS	123 (84.8%)	64 (90.1%)	0.6	0.25-1.51	0.4
exoT	138 (95.2%)	66(93.0%)	1.5	0.46-4.88	0.5
exoU	38(26.2%)	15(21.1%)	1.3	0.67-2.62	0.4
exoY	128(88.3%)	65(91.5%)	0.7	0.26-1.85	0.6

1Q, 3Q 25th (Q1) and 75th (Q3) percentiles; CI, confidence interval; ICU, intensive care unit; MBL, metallo beta-lactamase resistance; MDR, multidrug resistance; MIC, minimal inhibitory concentration; OD, optical density; ODc, optical density cut-off; OR, odds ratio; XDR, extensively-drug resistant; (exoS, exoT, exoU, exoY). *Moderate or strong biofilm producers and weaker and absent biofilm producers are shown together as separate categories.

Among genes encoding T3SS proteins, the most widespread was *exoT*, which was present in 204 strains, while *exoY* (n=193) and *exoS* (n=187) were slightly less prevalent. *exoU* was found in 53 strains (including 26.2 %; n=16 from PNU infections). Furthermore, at least one of these virulence genes was found in 99% of the samples, with 188 isolates bearing three or more virulence factors. There were significantly more moderate to strong biofilm producers (77% vs 64%, $p=0.048$) in the strains from the female patients, with lower numbers of female patients in the ICU (7% vs 23%, $p=0.018$). Additionally, strains from the female patients were significantly more frequently XDR or MDR types (76% vs 62%, $p=0.038$); these differences may be related to the higher median age of the female group (female 64.5, range 47–76; vs. male 63, range 49–72). Also, we did not observe any statistically significant differences in the frequency of strains resistant to particular antimicrobials or bearing T3SS proteins between males and females, or between the biofilm producer categories (Table 1). No relationship was found between the ability to form biofilm and the presence of virulence genes, or between non-hospitalized vs. hospitalized patients.

DISCUSSION

The subject of our study was PA, a bacterium consistently associated with nosocomial infections. The number of BSIs caused by PA is growing, and in 2009–2010 around 3.8% of BSIs were caused by this bacterium compared with only 3% between 1992 and 1997. The number of cases of PNU caused by PA was 17% in 2010, a figure lower than in 1997 (21%) (19). PA had a prevalence of 13% in device-associated infections (DAIs) in UTIs in Poland (9). In contrast, the prevalence of PA-associated BSIs in very low birth weight newborns was only 1.3%, but this condition was associated with an extremely high fatality rate of 80% (25). A major problem faced by modern medicine is the need for medical devices to be used for patient therapy, especially in ICUs, as these devices are responsible for large numbers of hospital-acquired infections, particularly in critically ill patients. In this population, a significant number of UTIs and BSIs are associated with DAIs (19). In Poland, the number of such infections can be larger than in other countries. Indeed, the incidence of catheter-associated UTIs in adult patients was 7.2/1000 catheter-days in 2014 (9), a figure higher than that in the NHSN/CDC (2012) report (8). Furthermore, the device utilization ratio in ICUs in Poland is high; therefore the risk of DAIs is correspondingly high (9, 24, 25). However, our laboratory-based study has no data on the use of medical devices; unfortunately, device-related infections result from the multifaceted interaction of PA, the device, and patient, but bacterial factors probably play the most important role in the pathogenesis of DAIs. Also, it has been reported that different bacteria use different mechanisms to colonize medical devices (23).

How severe an infection with PA becomes is multifactorial, but depends mainly on the presence of the following two virulence determinant types in this bacterium: 1) virulence factors involved in acute infections (usually secreted) and membrane bound factors and, 2) virulence factors involved in chronic infections (i.e., siderophores, alginate biosynthesis) (6). Biofilm production is also a very important virulence trait. A bacterium's ability to form a biofilm is linked to multiple factors including its ability to move and its possession of specific proteins. Whether biofilm-producing strains have the ability to produce effector proteins, such as Exo is an interesting question.

For our strains, we saw no difference in the presence of genes encoding effector proteins between the biofilm-producers and the non-producers. The prevalence of effector proteins was high for *exoT*, and *exoY*, which were present in almost all of the strains. *ExoS* was somewhat less prevalent (found in 82.8% of the strains). Only the *ExoU* gene, which encodes the most cytotoxic of the type III secretion proteins, was less prevalent, being detected in about one-quarter of the isolates from patients with PNU, but this level is still worrisome. According to other studies, *ExoU* secretion is a marker for highly virulent strains in patients with hospital-acquired PNU (5, 22). Strains with the ability to produce biofilms and possessing the *exoU* gene are considered to be highly virulent and may cause therapeutic problems. However, it should be emphasized that only the absence of a gene provides clear evidence that the gene is not functional, as the presence of a gene does not necessarily mean that the gene is expressed. In our research, the genetic potential of PA strains affecting their virulence was determined. Certainly, the lack of experiments on the expression of genes was a limitation in this article. For that reason, further studies are necessary to show that the four *exo* genes are functional. Similarly, the study of the ability to biofilm formation created in vitro allowed us to assess the possibility of a strain and not its traits actually presented during the infection.

As was expected in this study, most of the PA strains tested were able to form biofilms on abiotic surfaces (96-well plates), especially the strains isolated from ICU infection cases where the number of biofilm producers was 4-times higher than that of the non-hospitalized patients; however, surprisingly, there was no difference in the frequency of biofilm producers among strains that exhibited different levels of antimicrobial resistance. Furthermore, while most of the strains possessed at least one T3SS gene, no association was observed between the strains carrying T3SS genes and biofilm production. It was also not expected that the strains isolated from ICUs were characterized by a reduced ability for biofilm formation, compared with the strains obtained from the other sources.

Our previous data indicate serious potential therapeutic problems related to high antibiotic resistance in non-fermentative bacilli in Polish hospitals. The growing prevalence of MDR and XDR bacteria is challenging for clinicians as the treatment options are limited for patients with such infections (4). Antibiotic resistance of biofilm is related to decreased growth rate and decreased penetration of drug through the biofilm matrix, rather than having a particular antibiotic resistance genes of biofilms producers. Therefore, it will be interesting to consider the relationship between drug resistance and the ability to form biofilms in a comprehensive and thorough future study.

Conflict of interest

The authors declare no competing financial interests.

Funding

This work was supported by two grants from the National Science Centre (No.UMO-2012/05/B/NZ7/02880 and No 2012/05/N/NZ7/00786). The sponsor provided the funding for the project only.

The authors contributed equally to this work.

REFERENCES

1. Ajayi T, Allmond LR, Sawa T, et al. Single-nucleotide-polymorphism mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system. J Clin Microbiol 2003; 41: 3526-31.
2. Annual Epidemiological Report 2014 – Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections; <http://ecdc.europa.eu/>
3. Borges S, Silva J, Teixeira P. Survival and biofilm formation by Group B streptococci in simulated vaginal fluid at different pHs. Antonie Van Leeuwenhoek 2012; 101: 677-82.
4. Chmielarczyk A, Pobiega M, Ziolkowski G et al. Severe infections caused by multidrug-resistant non-fermentative bacilli in Southern Poland. Adv Clin Exp Med 2018 Mar 13 doi:10.17219/accm/68545;
5. Darouiche RO. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. Clin Infect Dis 2001; 33: 1567–72.
6. Diaz MR, King JM, Yahr TL. Intrinsic and Extrinsic Regulation of Type III Secretion Gene Expression in *Pseudomonas Aeruginosa*. Frontiers in Microbiology 2011; 2: 89.
7. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Microbes Infect 2003; 5: 1213-9.
8. Dudeck MA, Weiner LM, Allen-Bridson K, et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) report, data summary for 2012, Device-associated module. Am J Infect Control 2013; 41: 1148-66.
9. Duszyńska W, Rosenthal VD, Szczesny A, et al. Urinary tract infections in intensive care unit patients - a single-centre, 3-year observational study according to the INICC project. Anaesthesiol Intensive Ther 2016; 48: 1-6.
10. Hauser AR, Cobb E, Bodi M, et al. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Crit Care Med 2002; 30: 521-8.
11. Lee K., Y. S. Lim, D. Yong, J. H. et al. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2003; 41: 4623-9.
12. Ma Q, Zhai Y, Schneider JC, et al. Protein secretion systems of *Pseudomonas aeruginosa* and *P.fluorescens*. Biochim Biophys Acta 2003; 1611: 223-33.
13. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect 2012; 18: 268-81.
14. Mikkelsen H., Bind N. J., Skindersoe M. E. et al. Biofilms and type III secretion are not mutually exclusive in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology 2009; 155: 687–98.
15. O'Callaghan J, Reen FJ, Adams C, et al. A novel host-responsive sensor mediates virulence and type III secretion during *Pseudomonas aeruginosa*-host cell interactions. Microbiology. 2012; 158: 1057-70.
16. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. J Vis Exp 2011; 47: 2437.
17. Pobiega M, Maciag J, Pomorska-Wesolowska M, et al. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* among children in Southern Poland: Virulence factors and antibiotic resistance. J Pediatr Urol 2016; 12: 36.e 1-6.

18. *Pobiega M, Wojkowska-Mach J, Maciag J, et al.* Virulence and Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Urinary Tract Infections in Southern Poland. *Chemotherapy (Basel)* 2014; 60: 253-60.
19. *Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, et al.* Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med* 1999; 27: 887-92.
20. *Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, et al.* Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis* 2001; 183: 1767-74.
21. *Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN.* The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect* 2000; 2: 1721-31.
22. *Schulert GS, Feltman H, Rabin SD, et al.* Secretion of the toxin *ExoU* is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia. *J Infect Dis* 2003; 188: 1695-706.
23. *Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, et al.* Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013; 34: 1-14.
24. *Wójkowska-Mach J, Baran M, Drwila R, et al.* Ventilator-associated pneumonia after cardiac surgery. *Anaesthesiol Intensiva Ther* 2009; 41: 224-8.
25. *Wojkowska-Mach J, Borszewska-Kornacka M, Domanska J, et al.* Late-Onset Bloodstream Infections of Very-Low-Birth-Weight Infant. Data from the Polish Neonatology Surveillance Network in 2009-2011. *BMC Infectious Diseases* 2014; 14: 339.

Otrzymano: 18 XII 2017 r.

Adres Autora: 31-121 Kraków, ul. Czysa 18, Katedra Mikrobiologii Wydział Lekarski, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum

E-mail: agnieszka.chmielarczyk@uj.edu.pl

Porównanie testów real-time PCR do ilościowego oznaczania DNA wirusa cytomegalii z użyciem systemu LightCycler 2.0 u pacjentów hematologicznych

Results comparison of cytomegalovirus viral load in hematological patients using real-time PCR assays designed for LightCycler 2.0 system

Maciej Przybylski^{1,2}, Tomasz Dzieciatkowski^{1,2}, Anna Żuk-Wasek¹, Anna Waszczuk-Gajda³, Jarosław Biliński³, Paulina Boczek², Marta Wróblewska^{1,4}

¹Zakład Mikrobiologii, Samodzielny Publiczny Centralny Szpital Kliniczny

²Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

³Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych, Warszawski Uniwersytet Medyczny

⁴Zakład Mikrobiologii Stomatologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Przeprowadzono porównanie laboratoryjnej użyteczności pięciu diagnostycznych testów do wykrywania DNA CMV opartych na technice real-time PCR. Wykazano celowość wprowadzenia międzynarodowego układu kalibratorów, jako narzędzia dla międzylaboratoryjnej standaryzacji wyników wirerii CMV uzyskiwanych metodami molekularnymi.

Słowa kluczowe: wirus cytomegalii, zakażenia potransplantacyjne, diagnostyka molekularna, real-time PCR

ABSTRACT

Introduction: Human cytomegalovirus infections are the major viral complications associated with the post-transplant period in haematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. Clinical research suggests a role for viral load measurement in predicting and monitoring CMV-associated diseases. Early detection of cytomegalovirus infection with molecular biology methods is favorable for the efficacy of antiviral chemotherapy. Our point of interest was comparing specificity and level of detection of cytomegalovirus DNA in plasma and whole blood specimens with different commercial CMV kits, as well as “in-house” method, designated for the LightCycler 2.0 system.

Materials and Methods: 59 plasma and 37 whole blood samples (total number of 96), taken from patients after allogeneic stem cells transplantation, were tested for the presence of CMV DNA using the LightCycler 2.0 instrument with qPCR tests coming from Roche®, Artus/Qiagen®, GeneProof® and ALPCO®. The fifth method used was “in-house” real-time PCR assay, based on TaqMan chemistry.

Results: Results for samples containing a low cytomegalovirus load were more accurate with the Artus/Qiagen® and Roche® tests, than were results obtained with different kits, which underestimated the viral load of samples containing low DNA copy numbers.

Conclusions: Comparison of all methods used in present work indicates that employment of real-time PCR is advisable in common post-transplantation diagnostics. The high level of sensitivity and specificity provided by most of the tests using LightCycler instrument are favorable for the use of this system in the detection of CMV DNA. In addition, convenience of usage and short time of test performance makes this method suitable for both routine cytomegalovirus screening in different clinical specimens and monitoring of the proper antiviral therapy.

Key words: cytomegalovirus, post-transplant infections, molecular diagnostics, real-time PCR

WSTĘP

Zakażenia powodowane przez ludzkiego wirusa cytomegalii (CMV, HHV-5), a będące wynikiem jego reaktywacji ze stanu latencji, mogą manifestować się różnymi objawami i ich nasileniem, są też poważnym zagrożeniem dla pacjentów poddanych immunosupresji w wyniku transplantacji komórek krwiotwórczych czy narządów unaczynionych oraz osób zakażonych HIV (7, 11). Nasilenie objawów klinicznych wynikających z reaktywacji CMV uzależnione jest od rodzaju zastosowanego przeszczepu, wydolności układu odpornościowego biorcy oraz typu zastosowanego leczenia immunosupresyjnego (11).

Wczesne wykrycie obecności wirusowego DNA w próbkach krwi lub osocza osób poddanych zabiegowi przeszczepienia, a następnie wprowadzenie specyficznego leczenia wyprzedającego (ang. *pre-emptive therapy*) i monitorowanie jego wpływu na replikację materiału genetycznego wirusa jest obecnie podstawą leczenia choroby CMV. Postępowanie takie jest wynikiem licznych obserwacji, które wykazały, że liczba kopii wirusa w mililitrze krwi (ang. *viral load*; VL): (i) jest w wysokim stopniu związana z objawami klinicznymi choroby CMV, (ii) jest bardzo dobrym czynnikiem prognostycznym dla rozwoju choroby oraz (iii) daje cenne informacje o odpowiedzi pacjenta na leczenie przeciwwirusowe (1,2,13). Obecnie za „złoty standard” wykrywania DNA CMV w próbkach klinicznych pacjentów z grup ryzyka uważane są metody oparte na technice PCR z detekcją w czasie rzeczywistym (ang. *real-time PCR*; qPCR) (2,7).

Testy qPCR wykorzystywane w diagnostyce mikrobiologicznej zazwyczaj bazują na sondach hydrolizujących typu TaqMan®. Są one wyznakowane na końcu 5' fluorescencyjnym barwnikiem reporterowym, a na końcu 3' wygaszaczem. Bliska obecność wygaszacza w natywnej formie sondy pochłania energię fluorescencji barwnika reporterowego. Jeżeli w mieszaninie reakcyjnej znajduje się swoisty produkt PCR, następuje hybrydyzacja sondy do komplementarnej nici DNA. Podczas wydłużania produktu reakcji sonda ulega degradacji przez zmodyfikowaną polimerazę Taq o własnościach 5'-egzonukleolitycznych, w wyniku czego fluorochrom zostaje oddzielony od wygaszacza. Proces ten powoduje emisję fluorescencji, której natężenie mierzone jest po każdym cyklu reakcji (14).

Ilościowy wariant qPCR pozwala również obliczyć początkową liczbę kopii badanego fragmentu DNA, jaka była obecna w próbce przed reakcją. W tym celu wykorzystuje się

moment, w którym poziom fluorescencji barwnika przekroczy próg nazywany cyklem progowym (ang. *cycle threshold*; Ct) lub punktem przecięcia (ang. *crossing point*; Cp), bowiem im wcześniej fluorescencja próbki wzrasta do poziomu, który umożliwia wiarygodny odczyt i wejście reakcji w fazę logarytmicznego przyrostu ilości produktu, tym większa była początkowa ilość kopii badanej sekwencji w próbce na początku reakcji. W celu zbadania liczby kopii badanej sekwencji w próbce sporządza się serię rozcieńczeń roztworu o znanym stężeniu i liczbie kopii DNA, wyznacza się według nich krzywą standardową i mając dany punkt Ct (Cp) na podstawie krzywej standardowej szacuje się liczbę cząsteczek.

Celem pracy było porównanie wartości porównanie wybranych parametrów analitycznych pięciu metod qPCR opracowanych dla systemu LightCycler 2.0 (czterech metod komercyjnych i jednej metody „*in-house*”) w próbkach krwi pełnej i osocza pobranych od pacjentów hematologicznych poddanych allogenicznemu przeszczepieniu komórek krwiotwórczych.

MATERIAŁ I METODY

Próbki kliniczne i standardy wirusa. Próbki krwi pełnej ($n=37$) oraz osocza ($n=59$) pochodziły od pacjentów ($n=96$) hospitalizowanych w okresie trzech lat w Klinice Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. W badaniu tym wykorzystano próbki kliniczne zidentyfikowane wcześniej jako pozytywne w kierunku DNA CMV przy użyciu rutynowo stosowanej procedury diagnostycznej z wykorzystaniem zestawu RealArt CMV LC PCR Kit (Artus). Wszystkie próbki krwi, w tym próbki z których uzyskano osocze, pobierano do probówek z cytrynianem sodu jako antykoagulantem.

Ludzki wirus cytomegalii, szczep AD-169, był namnażany w linii komórkowej MRC-5 (ATCC: CCL-171), do osiągnięcia efektu cytopatycznego obejmującego 70% hodowli komórkowej. Następnie z całkowitego lizatu komórkowego przygotowano seryjne 10-krotne rozcieńczenia wirusa (w zakresie od 10^0 do 10^{-6}).

Do analizy ilościowej testów komercyjnych użyto kalibratorów dostarczonych przez producentów testów. Jako zewnętrzne kalibratory reakcji we wszystkich metodach qPCR zastosowano seryjne rozcieńczenia szczepu AD-169 CMV namnożonego w linii komórkowej MRC-5. Do przygotowywania kalibratorów stosowanych w metodzie „*in-house*” wykorzystano seryjne rozcieńczenia AD-169 CMV. Kalibrację rozcieńczeń DNA AD-169 CMV przeprowadzono przez obliczenie średniej wartości z ilościowych wyników uzyskanych w 3 niezależnych powtórzeniach za pomocą zestawu RealArt CMV LC PCR Kit (Artus).

Izolacja DNA. Próbki kliniczne stosowane w tym eksperymencie przechowywano w temperaturze -20°C przez różny czas, wynoszący od jednego tygodnia do prawie trzech lat, w związku z czym DNA z wszystkich próbek krwi i osocza wyodrębniono *de novo*, tuż przed badaniem, równolegle do ekstrakcji DNA z rozcieńczeń namnożonego *in vitro* szczepu AD-169 CMV. Do izolacji wykorzystano zestaw DNA High Pure Viral Nucleic Acid Kit (Roche Diagnostics), zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. Wyizolowany z 200 μl materiału klinicznego DNA zawieszano w końcowej objętości 50 μl H_2O i przechowywano w temperaturze -20°C aż do wykonania oznaczeń.

Oznaczenia real-time PCR. Amplifikację i wykrywanie DNA wirusa cytomegalii przeprowadzono stosując pięć metod: LightCycler CMV Quant Kit (Roche, Bromma, Szwecja - zwany dalej „Roche”), Human Cytomegalovirus PCR Detection Kit (GeneProof, Brno, Czechy - dalej określany jako „GeneProof”), RealArt CMV LC PCR Kit (Artus-Qiagen, Hamburg, Niemcy - zwany dalej „Artus”), MutaREAL Cytomegalovirus Kit (ALPCO Diagnostics, Salem, USA - zwany dalej „Alpco”) oraz test opracowany w Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Lekarskiej WUM, dalej określany jako „*in-house*”. Ostatnia z powyższych metod, opracowana przez *Chabros* i wsp. (5), wykorzystywała startery i sondy do komplementarnego do genu IE2 regulującego białko (UL122). Amplifikację przeprowadzono przy użyciu zestawu reakcyjnego TaqMan Master Kit (Roche). Podstawowe cechy porównywanych testów przedstawiono w Tabeli I.

Tabela I. Charakterystyka użytych testów do wykrywania DNA CMV

Nazwa testu	Rodzaj zastosowanych barwników fluorescencyjnych	Amplifikowany region CMV	Granica oznaczalności (LOD)	Kontrola wewnętrzna dostępna w zestawie	Liniiowość zestawu	Liczba kalibratorów	Jednostki w których podawany jest wynik
LightCycler CMV Quant Kit Roche	Scorpions	UL54	235 kopii/ml	Tak	$7,0 \times 10^2 - 6,5 \times 10^8$	4	Kopie/ml próbki
Human Cytomegalovirus PCR Detection Kit GeneProof	TaqMan	IE4	Brak danych	Nie	$10^1 - 10^4$	4	Kopie/ μ l matrycowego DNA
RealArt CMV LC PCR Kit Artus-Qiagen	TaqMan	UL122	650 kopii/ml	Tak	$10^1 - 10^4$	4	Kopie/ml próbki
MutaREAL Cytomegalovirus ALPCO	TaqMan	Brak danych	Brak danych	Nie	$10^2 - 10^4$	3	Kopie/ μ l matrycowego DNA
“ <i>In house</i> ” real-time PCR CMV	TaqMan	UL122	575 kopii/ml	Nie	$5,5 \times 10^2 - 5,1 \times 10^5$	4	Kopie/ml próbki

Wszystkie testy przeprowadzono w termocyklerze Roche LightCycler 2.0 z użyciem oprogramowania LightCycler Software, wersja 4.1. Ze względu na brak kompletnych danych dotyczących regionów amplifikowanych we wszystkich wykorzystanych komercyjnych testach qPCR, typów sond i sekwencji starterów oraz sond w dokumentacji dostarczonej z testami zewnętrznymi, parametry te nie zostały wzięte pod uwagę.

Analiza statystyczna. W celu porównania wyników ilościowych użyto testu χ^2 . Przed analizą parametryczną wszystkie uzyskane wartości VL przeliczono tak, aby uzyskać wyniki wyrażone w jednostkach zgodnych, ponieważ niektóre testy (Roche, Artus i „*in-house*”) prezentowały wyniki jako liczbę kopii DNA CMV na mililitr próbki klinicznej, podczas gdy inne (GeneProof i ALPCO) przedstawiały je jako liczbę kopii DNA CMV na mikrolitr matrycy DNA stosowanej w qPCR. Po powyższym przeliczeniu wszystkie war-

tości obciążenia wirusem zostały przekształcone na logarytmy dziesiętne. Jednoczynnikową analizę wariancji (one-way ANOVA) zastosowano do identyfikacji znaczących różnic między średnimi wartościami VL uzyskanymi przy użyciu wszystkich powyższych metod.

Osobnego porównania metod dokonano za pomocą metody Blanda-Altmana (3). Istotność statystyczną ustalono na poziomie $P < 0,05$. W analizie Blanda-Altmana, test RealArt został przyjęty jako metoda referencyjna dla próbek krwi w osoczu i krwi pełnej, ze względu na największą liczbę próbek, w których wykryto DNA CMV. W analizach statystycznych wykonanych testami Blanda-Altmana i ANOVA wykluczono próbki ujemne.

WYNIKI

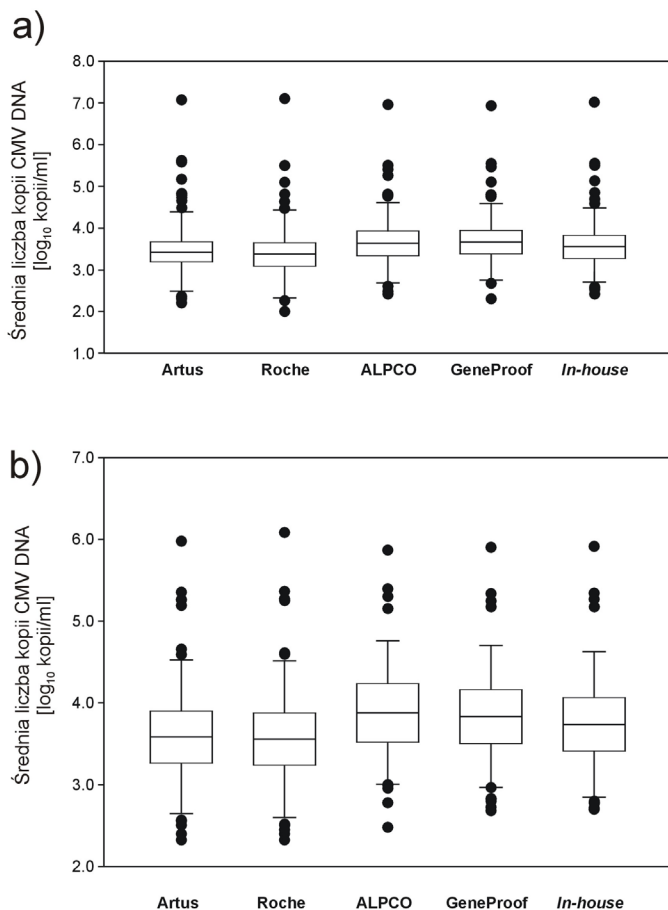
Za pomocą pięciu metod ilościowych dokonano oceny całkowitej liczby 59 próbek osocza oraz 37 próbek krwi pełnej. Cztery z pięciu ocenianych metod molekularnych nie wykryły DNA CMV we wszystkich próbkach, które zostały wcześniej zidentyfikowane jako pozytywne za pomocą testu odniesienia, którym był zestaw RealArt CMV LC PCR Kit (Artus). Test ALPCO wykrył DNA CMV w najmniejszej liczbie próbek, zarówno w przypadku krwi pełnej (26 z 37), jak i osocza (43 z 59). Natomiast zestaw produkcji firmy Artus dał najlepsze wyniki, wykrywając DNA CMV we wszystkich próbkach, w obu typach użytych próbek klinicznych. Statystycznie istotne różnice obliczone przy użyciu testu χ^2 obserwowano w przypadku próbek krwi pełnej pomiędzy testem Artus (stosowaną jako metoda odniesienia) a GeneProof ($P = 0,028$) oraz dla próbek osocza pomiędzy testami Artus a GeneProof ($P < 0,001$) oraz pomiędzy Artus a testem „in-house” ($P = 0,002$). Wyniki porównań użytych testów przedstawiono w Tabeli II.

Tabela II. Porównanie wyników uzyskanych za pomocą użytych testów do wykrywania DNA CMV

Nazwa testu	Liczba dodatnich próbek osocza, w których wykryto DNA CMV ($n=59$)	Wartość P w teście c2 (w odniesieniu do Artus RealArt)	Liczba dodatnich próbek krwi pełnej, w których wykryto DNA CMV ($n=37$)	Wartość P w teście c2 (w odniesieniu do Artus RealArt)
LightCycler CMV Quant Kit Roche	58 (98,3%)	$P=0,476$	37 (100%)	$P=1,0$
Human Cytomegalovirus PCR Detection Kit GeneProof	45 (76,3%)	$P<0,001$	30 (81,1%)	$P=0,028$
RealArt CMV LC PCR Kit Artus-Qiagen	59 (100%)	ND*	37 (100%)	ND*
MutaREAL Cytomegalovirus ALPCO	43 (72,9%)	$P<0,001$	26 (72,2%)	$P=0,005$
“In house” real-time PCR CMV	48 (81,4%)	$P=0,002$	32 (88,9%)	$P=0,107$

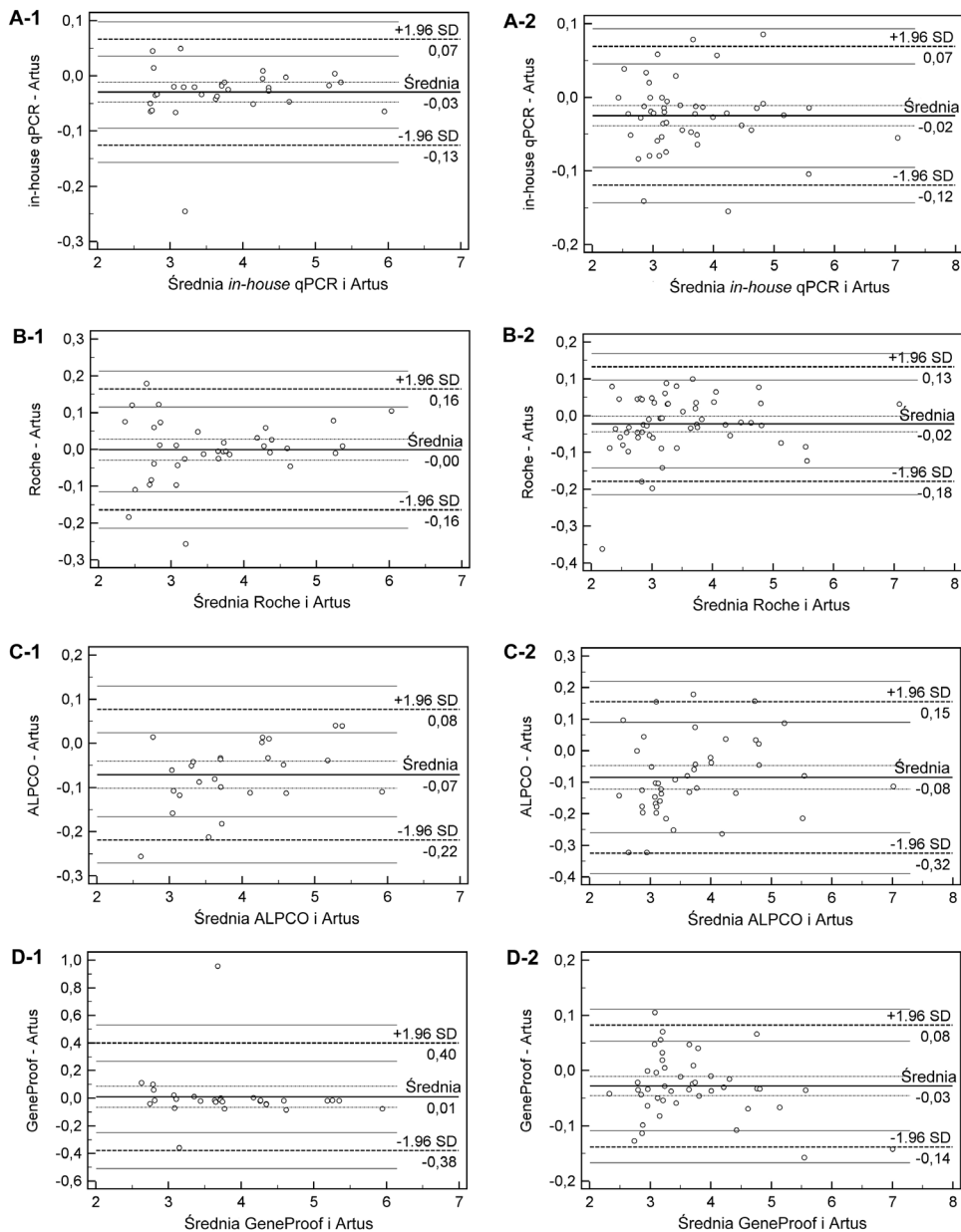
*) ND – nie dotyczy

W przypadku analiz ilościowych wykluczono wszystkie próbki ujemne. Średnie obciążenie wirusem wahało się od 3,373 kopii \log_{10} kopii/ml do 3,63 \log_{10} kopii/ml dla próbek osocza i od 3,558 \log_{10} kopii/ml do 3,885 \log_{10} kopii/ml dla próbek krwi pełnej (Ryc. 1).



Ryc. 1 Porównanie średniej liczby kopii CMV DNA wykrytej w (a) osoczu ($n=59$) i (b) krwi pełnej ($n=37$) przy użyciu pięciu różnych metod. Pozioma linia przedstawia wartość średnią, zamknięte prostokąty reprezentują dolny i górny 95% przedział ufności, a zewnętrzne słupki – wartości odchylenia standardowego

Różnice średnich wartości VL CMV pomiędzy badanymi metodami wynosiły od 0,025 \log_{10} kopii/ml do 0,29 \log_{10} kopii/ml dla próbek osocza, a od 0,029 \log_{10} kopii/ml do 0,327 \log_{10} kopii/ml dla próbek krwi pełnej, zaś jednoczynnikowa analiza wariancji nie wykazała istotnych różnic w średnich obciążeniach wirusem. Analiza za pomocą wykresów uzyskanych metodą Blanda-Altmana również nie wykazała istotnych różnic (Ryc. 2).



Ryc. 2. Wykresy Blanda-Altmana porównujące analizowane metody. A-1 – D-1: dla próbek osocza; A-2 – D-2: dla próbek krwi pełnej. Jako metodę odniesienia wykorzystano RealArt CMV LC PCR Kit (Artus-Qiagen)

DYSKUSJA

Monitorowanie i szybkie wdrożenie leczenia wyprzedzającego (ang. *pre-emptive therapy*) ma kluczowe znaczenie w terapii pacjentów z obniżoną odpornością – dotyczy to zwłaszcza infekcji wirusem cytomegalii (6,8,10). W ostatnim czasie pojawiło się wiele testów komercyjnych dedykowanych do wykrywania DNA CMV za pomocą metod biologii molekularnej, w tym wykorzystujących real-time PCR (7). Pomimo ogromnych zalet techniki qPCR, w tym bardzo wysokiej swoistości i czułości, metody diagnostyczne powinny posiadać pewne dodatkowe cechy. W pierwszej kolejności powinny one być w stanie wykrywać zarówno niskie, jak i wysokie poziomy wirerii. Po drugie, powinny one utrzymać liniowość w szerokim zakresie wartości obciążenia wirusem i po trzecie, metody takie muszą przedstawiać wyniki wyrażone w powszechnie akceptowanych i porównywalnych jednostkach. Ta ostatnia cecha jest niezmiernie istotna do porównywania uzyskiwanych wyników od rozmaitych pacjentów w różnych okresach obserwacji w poszczególnych laboratoriach (4).

Dodatkowe utrudnienia, niezależne od zastosowanej metody diagnostycznej, stwarza zastosowanie różnych metod ekstrakcji DNA: ręcznych i automatycznych, czy też odmiennych typów termocyklorów qPCR (12). Problemy w spójności wyników może także dawać wykorzystywanie różnych typów chemii stosowanej w reakcjach real-time PCR, długość ampliconu, sekwencje starterów i sondy/sond, czy nawet wybór amplifikowanego regionu genomu CMV. Nawet z teoretycznego punktu widzenia, taka liczba potencjalnych różnic w pomiarach wirerii CMV powinna być przedmiotem zainteresowania i prób standaryzacji. Powyższe problemy były zgłaszane już ponad dekadę temu po wprowadzeniu qPCR do monitorowania zakażeń wirusem cytomegalii, a mimo to nadal pozostają one nierozwiązane (1,9,15).

Według naszej opinii, wprowadzenie powszechnie przyjętego międzynarodowego układu kalibratorów, podobnego do dostępnego na rynku standardu WHO CMV, może być bardzo przydatnym narzędziem dla międzylaboratoryjnej standaryzacji wyników diagnostycznych, a co za tym idzie, dla ustalenia istotnych klinicznie wartości „cut-off” wirerii CMV i stosownego momentu wdrożenia leczenia przeciwwirusowego.

PIŚMIENNICTWO

1. Atkinson C, Emery VC. Cytomegalovirus quantification: Where to next in optimising patient management? *J Clin Virol* 2011; 51:223-8.
2. Baldanti F, Lilleri D, Gerna G. Human cytomegalovirus load measurement and its applications for pre-emptive therapy in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Oncol* 2008; 26:123-30.
3. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* 1999; 8:135-60.
4. Caliendo AM, Shahbazian MD, Schaper C i inni. A commutable cytomegalovirus calibrator is required to improve the agreement of viral load values between laboratories. *Clin Chem* 2009; 55:1701-10.

5. *Chabros L, Przybylski M., Dzieciatkowski T i inni.* Modyfikacja i optymalizacja metod PCR do wykrywania regionu MIE ludzkiego herpeswirusu typu 5. *Med Dosw Mikrobiol* 2008; 60:79-86.
6. *Diaz-Mitoma F, Leger C, Miller H i inni.* Comparison of DNA amplification, mRNA amplification, and DNA hybridization techniques for detection of cytomegalovirus in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2003; 41:5159-66.
7. *Dzieciatkowski T, Wróblewska M.* Zakażenia wirusem cytomegalii oraz ich diagnostyka laboratoryjna u biorców komórek krwiotwórczych. *Diagn Lab* 2015; 51:59-62.
8. *Gerna G, Lilleri D.* Monitoring transplant patients for human cytomegalovirus: Diagnostic update. *Herpes* 2006; 13:4-11.
9. *Habbal W, Monem F, Gartner BC.* Comparative evaluation of published cytomegalovirus primers for rapid real-time PCR: which are the most sensitive? *J Med Microbiol* 2009; 58:878-83.
10. *Ljungman P, de la Camara R, Cordonnier C i inni.* Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42:227-40.
11. *Osińska E, Tomaszewska A, Dzieciatkowski T.* Zakażenia betaherpeswirusami u osób z niedoborami odporności. *Post Mikrobiol* 2009; 48:267-76.
12. *Przybylski M, Dzieciatkowski T, Les K i inni.* Comparison of real-time PCR quantitative analysis of the cytomegalovirus DNA level using LightCycler 2.0 and LightCycler 480 instruments. *J Clin Virol* 2012; 55:270-73.
13. *Razonable RR, Emery VC.* Management of CMV infection and disease in transplant patients. *Herpes* 2004; 11:77-86.
14. *Rynans S, Walter de Walthoffen S, Dzieciatkowski T i inni.* Zastosowanie techniki real-time PCR w wirusologii. *Post Mikrobiol* 2015; 54:75-82.
15. *Yerly S, Perrin L, Van Delden C i inni.* Cytomegalovirus quantification in plasma by an automated real-time PCR assay. *J Clin Virol* 2007; 38:298-303.

Otrzymano: 3 XI 2017 r.

Adres Autora: 02-004 Warszawa ul. Chałubińskiego 5, Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Serologiczne markery wirusowego zapalenia wątroby typu B

Serological markers of hepatitis B virus

Joanna Wróblewska, Wiesława Chudobińska Kula,
Marcin Ziuziakowski, Jerzy Kasprzak

Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Bydgoszczy

Celem pracy była analiza danych dotyczących najczęściej oznaczanych w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Bydgoszczy markerów wirusowego zapalenia wątroby typu B u pacjentów szpitalnych i osób niehospitalizowanych. Oceniono częstość występowania dodatnich markerów (HBsAg, przeciwciał anti-HBc, przeciwciał anti-HBs) wirusowego zapalenia wątroby typu B. Przeciwciała anti-HBc wykryto u dwóch z dziesięciu badanych chorych (20,0%). U trzech spośród 291 (1,0%) osób stwierdzono obecność antygenu HBsAg. Ochronny poziom przeciwciał anti-HBs wykazano u 71 (84,5%) osób spośród 84 badanych.

Słowa kluczowe: *metoda enzymoimmunofluorescencyjna, markery wirusowego zapalenia wątroby typu B*

ABSTRACT

Introduction: HBV diagnosis is accomplished by testing for a series of serological markers: HBsAg, anti-HBc, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe. The aim of the study was to collect the data on serological detection of markers of Hepatitis B Virus hospitalized patients and not hospitalized persons. The study assessed the incidence of HBV markers (HBsAg, anti-HBc, anti-HBs).

Material and method: A blood serum samples for diagnosis of HBV markers (385 screening tests) by enzyme-linked immunoassay test (VIDAS tests) were used in the study. 291 serum samples were tested for the presence of HBsAg, 10 serum samples were tested for the anti presence of anti-HBc and 84 serum samples were tested for the presence of anti-HBs.

Results: Three (1.0%) blood samples were found to be positive for HBsAg, two (20.0%) to be positive for anti-HBc. Anti-HBc was not detected among three HBsAg positive specimens. Serum anti-HBs titers > 10 mUI/ml was considered positive. In the present study 71 (84.5%) anti-HBs positive serum samples were detected.

Conclusions: In Provincial Sanitary and Epidemiological Station in Bydgoszcz the most commonly identified marker of Hepatitis B Virus in hospitalized patients and not hospitalized persons is HBsAg.

Keywords: *enzyme linked fluorescent assay, markers of Hepatitis B Virus*

WSTĘP

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu B (Hepatitis B Virus, HBV, WZW typu B) występuje powszechnie na świecie. Zakażenie HBV przenoszone jest głównie drogą pozajelitową, przez przerwanie ciągłości skóry i błon śluzowych, przez kontakty seksualne i drogą wertykalną (zakażenie płodu, noworodka, niemowlęcia) (9). Wirus HBV poza krwią może być też obecny w wydzielinie z ran, w nasieniu, w wydzielinie pochwy i ślinie (9). Zakażenie to należy do wirusowych zakażeń szpitalnych i jest jedną z chorób zawodowych wśród pracowników służby zdrowia. Kontakt błon śluzowych lub uszkodzonej skóry z krwią potencjalnie zakaźną, jej pochodnymi, tkankami oraz płynami ustrojowymi związany jest także z ryzykiem zakażenia wirusem zapalenia wątroby typ C (Hepatitis C Virus, HCV, WZW C), wirusem nabytego niedoboru odporności (Human Immunodeficiency Virus, HIV).

Diagnostyka wirusologiczna HBV polega głównie na wykrywaniu markerów serologicznych. Metody te oparte są na identyfikacji antygenu powierzchniowego HBV (surface antigen of Hepatitis B Virus, HBsAg) występującego w lipoproteinowej otoczce, przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi powierzchniowemu HBV (antibodies to surface antigen of Hepatitis B Virus, anti-HBs), przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi rdzeniowemu HBV (antibodies to core antigen of Hepatitis B Virus, anti-HBc), przeciwciał skierowanych przeciwko antygenowi e HBV (antibodies to e antigen of Hepatitis B Virus, anti-HBe) i wykrywaniu antygenu e HBV (e antigen of Hepatitis B Virus, HBeAg) (5). Metoda łańcuchowej reakcji polimerazy (Polymerase Chain Reaction, PCR) pozwala na oznaczenie materiału genetycznego wirusa (HBV DNA) w próbce surowicy pacjenta (2).

Celem pracy była analiza danych zgromadzonych w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Bydgoszczy dotyczących najczęściej oznaczanych markerów WZW typu B u pacjentów hospitalizowanych i osób niehospitalizowanych.

MATERIAŁ I METODY

W okresie od stycznia 2014 r. do końca czerwca 2017 r. w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Bydgoszczy wykonano 385 badań przesiewowych w kierunku oceny obecności markerów serologicznych HBV. Próbkę surowicy krwi przebadano wykorzystując analizator immunoenzymatyczny VIDAS® PC (bioMérieux) i zestawy odczynników firmy bioMérieux (VIDAS HBs Ag Ultra, VIDAS HBs Ag Ultra Confirmation, VIDAS Anti HBs Total II, VIDAS Anti HBc Total II). Przed wykonaniem badań wykonywano kalibrację lub rekalkibrację dla każdego zestawu odczynników. Intensywność fluorescencji była mierzona automatycznie, a wyniki w kierunku oceny obecności HBsAg i przeciwciał anti-HBc w surowicy wyrażano w postaci indeksu obliczanego na podstawie roztworów standardowych. Stężenie przeciwciał anti-HBs wyrażano w jednostkach międzynarodowych (mIU/ml).

Potwierdzenie wyniku dodatniego w kierunku HBsAg wykonywano przy użyciu testu HBsAg Ultra Confirmation zawierającego przeciwciała „neutralizujące” przeciwciała anty-HBs. W przypadku oceny poziomu przeciwciał anty-HBs rozcieńczano tylko te próbki, które w pierwszym badaniu uzyskały wynik > 500 mUI/ml.

WYNIKI

Spośród 291 (w tym 270 próbek surowic krwi od pacjentów hospitalizowanych) próbek badanych w kierunku obecności HBsAg, w trzech (1,0%) próbkach, uzyskanych od osób w wieku 36, 37, 74 lat, stwierdzono obecność antygenu (Tabela I). Wszystkie przebadane próbki dodatnie pochodziły od pacjentów hospitalizowanych. Lekarze zlecający badanie w kierunku w/w serologicznego wykładnika zakażenia WZW typu B zlecali też wykonanie oznaczeń w kierunku obecności: przeciwciał anty-HCV (207 badań), przeciwciał anty-HIV-1/HIV-2 i antygenu p24 HIV (23 badania). W oparciu o przeprowadzone testy diagnostyczne nie stwierdzono wystąpienia współzakażenia. W przypadku próbek pobranych od osób niehospitalizowanych, poza określeniem występowania w surowicy krwi HBsAg, wykonano dodatkowe badania w kierunku obecności: przeciwciał anty-HCV (10 badań), przeciwciał anty-HIV-1/HIV-2 i antygenu p24 HIV (7 badań). Nie stwierdzono w badanych próbkach obecności antygenów i przeciwciał wirusowych.

Próbki surowic, badane pod kątem wykrywania przeciwciał anty-HBc total pochodziły wyłącznie od pacjentów hospitalizowanych (Tabela II). Wyniki dodatnie otrzymano badając próbki uzyskane od dwóch osób w wieku 49 i 81 lat.

Tabela I. Liczba wykonanych oznaczeń (wyników dodatnich) w kierunku obecności antygenu HBsAg w zależności od wieku i płci badanych osób.

Grupa wiekowa (lata)	Liczba wykonanych oznaczeń (liczba wyników dodatnich)			
	Osoby niehospitalizowane		Pacjenci hospitalizowani	
	Mężczyźni	Kobiety	Mężczyźni	Kobiety
1 do 14	0 (-)	0 (-)	0 (-)	0 (-)
15 do 25	0 (-)	2 (-)	8 (-)	10 (-)
26 do 64	18 (-)	0 (-)	100 (2)	62 (-)
> 64	3 (-)	1 (-)	60 (-)	27 (1)

Tabela II. Liczba wykonanych oznaczeń (wyników dodatnich) w kierunku obecności przeciwciał anty-HBc w zależności od wieku i płci badanych osób.

Grupa wiekowa (lata)	Liczba wykonanych oznaczeń (liczba wyników dodatnich)	
	Mężczyźni	Kobiety
1 do 14	0 (-)	0 (-)
15 do 25	0 (-)	0 (-)
26 do 64	7 (-)	2 (1)
> 64	1 (1)	0 (-)

Poziom przeciwciał anti-HBs określono u 84 osób (Tabela III). Badania dodatkowe w kierunku innych wirusowych czynników etiologicznych (WZW C, HIV) wykonano u sześciu osób niehospitalizowanych i 40 osób hospitalizowanych. Wszystkie przebadane próbki surowic krwi w kierunku tych czynników etiologicznych były ujemne.

Tabela III. Liczba wykonanych oznaczeń w kierunku obecności przeciwciał anti-HBs w zależności od wieku, płci badanych osób oraz stężenia przeciwciał (od < 9 mUI/ml do ≥ 101 mUI/ml).

Grupa wiekowa (lata)	Liczba wykonanych oznaczeń											
	Osoby niehospitalizowane						Pacjenci hospitalizowani					
	Mężczyźni			Kobiety			Mężczyźni			Kobiety		
	≥ 101	≥ 10	< 9	≥ 101	≥ 10	< 9	≥ 101	≥ 10	< 9	≥ 101	≥ 10	< 9
1 do 14	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
15 do 25	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	1	1
26 do 64	4	1	2	4	3	1	3	9	2	26	12	5
> 64	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1

Próbki uzyskane od 5 pacjentów przebadano w kierunku obecności przeciwciał anti-HBc total i antygenu HBs. Obecność przeciwciał anti-HBc total odnotowano zaledwie w jednej próbce, przy jednoczesnym braku obecności antygenu HBsAg. Wykonano jedno badanie w kierunku oznaczenia zarówno HBsAg, przeciwciał anti-HBc i przeciwciał anti-HBs. Nie stwierdzono obecności antygenu HBsAg i przeciwciał anti-HBc. Miano przeciwciał anti-HBs wynosiło powyżej 100 mUI/ml (1650 mUI/ml).

U 15 hospitalizowanych osób oznaczano antygen HBs i przeciwciała anti-HBs. U żadnej z badanych osób nie wykryto obecności antygenu HBs, natomiast u 12 osób wykryto przeciwciała ochronne. Trzy niehospitalizowane osoby zleciły badanie w kierunku wykrycia obecności HBsAg i przeciwciał anti-HBs. W dwóch przypadkach wyniki były ujemne. U jednej z badanych osób stężenie przeciwciał anti-HBs wynosił 336 mUI/ml. Nie wykryto natomiast u niej antygenu HBs.

Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Bydgoszczy nie otrzymała zleceń na wykonanie testu VIDAS w kierunku wykrycia obecności antygenu HBe i przeciwciał anti-HBe.

DYSKUSJA

W Polsce od kilkunastu lat obserwuje się znaczny spadek liczby zachorowań na ostre zapalenie wątroby typu B (4, 12). W dostępnym piśmiennictwie brak doniesień zawierających dane dotyczące najczęściej oznaczanych markerów WZW typu B u pacjentów hospitalizowanych i osób niehospitalizowanych.

Antygen HBs jest zasadniczym markerem zakażenia, dzięki któremu można rozpoznać zakażenie HBV (6, 9). Ten pierwszy marker serologiczny pojawiający się w przypadku ostrego zakażenia typu B był najczęściej określanym wskaźnikiem serologicznym w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Bydgoszczy. Badania wskazują, że około 1 do 2,0% populacji to nosiciele HBsAg (1). Z badań prowadzonych przez *Hartleb* i wsp. (3) wynika, że wśród osób po 65 roku życia częstość występowania HBsAg wynosi 1,16%. *Leźnicka* i wsp. (7) zebrali in-

formacje na temat niewykrytych zakażeń WZW typu B w populacji mieszkańców województwa kujawsko-pomorskiego. Stwierdzili obecność antygenu HBsAg u 34 (0,54%) osób. W obecnej pracy uzyskano podobne wyniki, gdyż dodatni test przesiewowy, zweryfikowany testem potwierdzenia, w kierunku HBsAg stwierdzono w przypadku badania trzech (1,0%) spośród 291 osób.

Dobrym punktem wyjścia w celu ustalenia dodatniego statusu serologicznego w oparciu o zlecenie jest oznaczenie HBsAg i przeciwciał anti-HBc IgM (10, 11). Obecność antygenu HBs świadczy o aktualnym zakażeniu HBV, jednak marker ten wykrywany jest też w stanie przewlekłego nosicielstwa. W związku z powyższym, wykrycie przeciwciał klasy IgM przeciw antygenowi rdzeniowemu decyduje o rozpoznaniu ostrego WZW typu B (9). Brak tych przeciwciał sugeruje zaostrzenie przewlekłego zakażenia HBV, albo nadkażenie HDV (10). Falszywie dodatnie wyniki badania przeciwciał IgM anti-HBc mogą pojawić się u pacjentów z wysokim poziomem czynnika reumatoidalnego (6). Tylko nieliczne zlecenia pozwoliły na wykonanie badania w kierunku oznaczenia przeciwciał anti-HBc. W dostępnym piśmiennictwie brak doniesień o częstości wykrywania tych przeciwciał.

Zanik wykrywalności HBsAg i pojawienie się przeciwciał anti-HBs oraz normalizacja aktywności enzymów wątrobowych jest powszechnie uważana za dowód ograniczenia zakażenia. W celu monitorowania zakażonych pacjentów lub potwierdzenia skuteczności szczepienia dokonywana jest ocena poziomu przeciwciał anti-HBs (9). Przeciwciała te pojawiają się późno w fazie zdrowienia, a ponieważ zwykle po kilkunastu latach znikają do niewykrywalnego miana, nie są dobrym wykładnikiem przebytego zakażenia (5, 10). Nie są one wykrywane, gdy choroba przechodzi w stan przewlekłego nosicielstwa (10). Poziom chroniący przed zakażeniem HBV u osób immunokompetentnych to stężenie przeciwciał anti-HBs powyżej 10 mUI/ml, a dla osób o osłabionej odporności powyżej 100 mUI/ml (8). Badania wykonane w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Bydgoszczy wykazały ochronny poziom przeciwciał anti-HBs u 71 z 84 (84,5%) niehospitalizowanymi osobami, które badania te wykonywały najczęściej po lub przed pobytem w szpitalach. Powszechnie wiadomo, że osoby mające choroby przewlekłe np. przewlekłą niewydolność nerek lub białaczkę, gorzej odpowiadają na szczepienia (9). Dodatkowo, niski poziom wirusa HBV nie zawsze wiąże się z brakiem uzyskania odporności trwałej po szczepieniu, gdyż różne typy antygenów zastosowanych w szczepionkach i użytych w testach mogą powodować otrzymanie zmiennych wyników.

Nie u wszystkich pacjentów, u których podejrzewa się WZW typu B należy oznaczać „przypadkowe” markery serologiczne, np. obecność antygenu HBsAg i przeciwciał anti-HBs. Na skierowaniu do wykonania badania nie ma informacji o stanie klinicznym pacjenta, brak też informacji czy osoba przyjmująca zlecenie wyjaśniła osobie zainteresowanej badaniem, znaczenie diagnostyczne tych markerów serologicznych. Należy pamiętać, że niezwykle rzadko wykrywa się zarówno przeciwciała anti-HBs (niskie miano) i antygen HBsAg (6). Obecność u chorych tych markerów serologicznych pozwala wtedy stwierdzić nadostre zapalenie wątroby. Obecność tego kompleksu immunologicznego wiąże się też z przewlekłymi następstwami WZW typu B (6, 9).

W badaniach epidemiologicznych zwraca się uwagę na czynniki ryzyka zakażenia HBV zależne od gospodarza np.: wiek, płeć pacjenta. W oparciu o przedstawione w naszej pracy wyniki nie można powiedzieć, czy płeć oraz wiek pacjenta ma istotny wpływ na częstość występowania dodatnich markerów zakażenia HBV. Zarówno *Hartleb* i wsp. (3) oraz *Leżnicka* i wsp. (7) nie stwierdzili występowania związku między wykrytymi zakażeniami a płcią osób badanych.

Odmienne informacje przedstawione są przez Urząd Marszałkowski Województwa Kujawsko – Pomorskiego sugerujących zapadalność na WZW typu B dwukrotnie wyższą wśród mężczyzn niż wśród kobiet (12). Ponadto, najwyższa zapadalność wśród zachorowań ostrych, jak i przewlekłych notowana jest w grupach wiekowych odpowiednio 35-39 i 15-19 lat. Zapadalność na ostre WZW B jest najwyższa w grupach: 25-29, 35-39 lat oraz w grupie osób starszych - powyżej 75 roku życia. Zachorowania przewlekłe są najczęstsze w grupie wiekowej 15-19 lat. W obecnej pracy nie odnotowano przypadku współzakażenia HBV z HCV lub HIV. Według dostępnych materiałów, w 2012 roku zgłoszono ogółem w Polsce 1583 zachorowań związanych z HBV, a 33 przypadki związane były zarówno z wykryciem HBV jak i HCV (wg 1).

PODSUMOWANIE

1. Liczba wykonywanych badań w kierunku obecności markerów HBV wskazuje na wzrost świadomości społecznej dotyczącej profilaktyki chorób zakaźnych.
2. Najczęściej oznaczanym markerem serologicznym WZW typu B jest antygen HBsAg.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bojer E.* Ukryte zakażenie wirusem HBV w hematologii i transfuzjologii. *Acta Haematol Pol* 2009; 40: 435–49.
2. *Dunal M, Trzcińska A, Siennicka J.* Wirus cytomegalii – problem zakażeń wrodzonych. *Post -Mikrobiol* 2013, 5: 17-28.
3. *Hartleb M, Gutkowski K, Zejda JE i inni.* Serological prevalence of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection in the elderly population: Polish nationwide survey – PolSenior. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2012; 24: 1288-95.
4. *Hryniewicz HJ.* Profilaktyka poekspozycyjna zakażeń HBV, HCV i HIV u personelu medycznego. *Med Dopl* 2006; 15: 35-8.
5. *Jabłońska J, Grabowski ML.* Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B – diagnostyka, obraz kliniczny i leczenie. *Med Dopl* 2006; 15: 23-7.
6. *Kasper DL, Fauci AS.* Harrison - Choroby zakaźne. Wydawnictwo Czelej Sp. z o.o. Lublin 2012.
7. *Leźnicka M, Gierlotka K, Prycel T.* Justification for screening programs for early detection of HBV infections. *Med Pr* 2014; 65: 777-84.
8. *Madaliński K.* Recent advances in Hepatitis B vaccination. *Hepatitis B Annual* 2008; 5: 51-65.
9. *Magdzik W.* Wirusowe zapalenie wątroby typu B (WZW B). *Zakażenia* 2008; 3: 53-61.
10. *Maguire JD.* Zakaźne zapalenie wątroby 1999; *Zakażenia* 3-4: 20-7.
11. World Health Organization. Guidelines on hepatitis B and C testing 2017.
12. Załącznik do uchwały Nr 5/103/16 Zarządu Województwa Kujawsko-Pomorskiego z dnia 3 lutego 2016 r. Program wykrywania zakażeń WZW B i C w województwie kujawsko – pomorskim. Urząd Marszałkowski Województwa Kujawsko – Pomorskiego 2016.

Otrzymano: 29 XI 2017 r.

Adres Autora: 85-031 Bydgoszcz, ul. Kujawska 4, Oddział Diagnostyki Medycznej. Pracownia Wirusologii, Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Bydgoszczy.

Właściwości i zastosowanie miedzi przeciwdrobnoustrojowej w zapobieganiu zakażeniom szpitalnym w placówkach medycznych

Properties and use of antimicrobial copper in the prevention of nosocomial infections in medical facilities

Anna Kinga Kierzkowska

Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia
Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Wielolekooporne szczepy bakterii są jedną z głównych przyczyn zakażeń wśród pacjentów w szpitalach na całym świecie. Obecnie priorytetem wszystkich placówek medycznych jest ograniczenie rozprzestrzeniania się drobnoustrojów i zmniejszenie ryzyka ich występowania. W tym celu prowadzi się m.in. kampanie poświęcone prawidłowej higienie rąk, która jest podstawą w ograniczeniu rozprzestrzeniania się patogenów. W szpitalach coraz częściej stosuje się elementy wyposażenia wewnętrznego powleczone stopami miedzi przeciwdrobnoustrojowej, które mają za zadanie ograniczenie rozprzestrzeniania się drobnoustrojów.

Słowa kluczowe: miedź przeciwdrobnoustrojowa, dezynfekcja, zakażenia szpitalne

ABSTRACT

Multi-drug resistant bacterial strains are one of the main causes of infection among patients in hospitals around the world. Currently, the priority of all facilities is to limit the spread of microorganisms and reduce the risk of their occurrence. For this purpose, among others, campaigns devoted to proper hand hygiene, which are the basis for limiting the spread of pathogens. All over the world, in medical facilities, there are more and more elements of internal equipment coated with antimicrobial copper alloys. There is evidence that the use of such elements is an effective method of reducing the development of microorganisms

Keywords: Antimicrobial copper, disinfection, antimicrobial activity, nosocomial infections

WSTĘP

Antybakteryjne właściwości miedzi znane są od tysięcy lat. W okresie starożytnym, w Indiach, Grecji i Egipcie, miedź dzięki swoim właściwościom fizyko-chemicznym była stosowana w metaloterapii – alternatywnej metodzie leczenia i zapobiegania rozwojowi chorób poprzez kontakt miedzi z chorą częścią ciała. Grecy żołnierze zdrapywali miedź ze swoich mieczy i przykładali ją na otwarte rany aby zapobiec infekcji. Aztekowie używali tlenku miedzi oraz malachitu do leczenia zmian skórnych. Amerykańscy pionierzy, zasiedlający nowe terytoria, umieszczali miedziane monety w beczkach na wodę aby odkazić wodę pitną (3). Egipcjanie do swoich zabiegów medycznych stosowali maści z domieszką miedzi aby zahamować rozwój infekcji. W Indiach stosowano naczynia do przechowywania żywności oraz naczynia do przechowywania wody wykonane ze stopów miedzi. Uważano, że naczynia wykonane z tego materiału zapobiegają rozwojowi chorób (7). Najstarszy zapis medyczny dotyczący zastosowania miedzi został zapisany w staroegipskim podręczniku medycznym - Smith Papirus około 2600 - 2200 roku p.n.e. Opisano w nim zastosowanie miedzi do odkażania ran klatki piersiowej i wody pitnej. Zastosowanie miedzi w medycynie stało się szeroko rozpowszechnione pod koniec IX wieku. Różne preparaty z zawartością miedzi były stosowane w przewlekłych stanach zapalnych, egzemach skórnych, w leczeniu gruźlicy, kiły, toczenia, nerwobólu twarzy (9).

Zakażenia szpitalne stanowią problem w placówkach medycznych na całym świecie. Według Europejskiego Centrum Zapobiegania i Kontroli Chorób (ECDC) w Europie trzy miliony infekcji szpitalnych jest przyczyną od 5000 do nawet 20000 zgonów rocznie. Ponad 80% chorób zakaźnych jest przenoszonych drogą kontaktową (1). Największy problem stanowią: metycylino-oporny *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* oraz *Clostridium difficile* (14). Leczenie powikłań u pacjentów niesie za sobą ogromne koszty i straty finansowe, sięgające około 5,5 mld euro rocznie. Z tego względu placówki medyczne coraz częściej sięgają po dodatkowe rozwiązania, które umożliwiłyby ograniczenie rozprzestrzeniania się zakażeń szpitalnych (14). Jednym z takich rozwiązań jest zastosowanie materiałów o powierzchni pokrytej certyfikowanym stopem miedzi (>60%). Jak udowodniły badania naukowe, miedź wykazuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe i wpływa na unieszkodliwianie mikroorganizmów patogennych odpowiedzialnych za zakażenia u ludzi (2, 3, 14, 15, 11).

CHARAKTERYSTYKA MIEDZI

Miedź jest metalem ciężkim o barwie pomarańczowo-czerwonej o gęstości 8,96 g/cm³. Pozyskiwana jest z rudy miedzi na całym świecie, głównie w Chile, Peru, Chinach, Stanach Zjednoczonych i Australii. Miedź w środowisku naturalnym występuje w postaci rodzimej oraz rudach siarczkowych: chalkozynie i chalkopirycie. Temperatura topnienia miedzi wynosi 1084,88 °C. Po wytopieniu i oczyszczeniu przybiera postać miękkiego metalu charakteryzującego się dobrym przewodnictwem elektrycznym i cieplnym. Miedź jest odporna na wilgoć i korozję (4). W małych ilościach miedź jest pierwiastkiem niezbędnym do życia roślin i zwierząt, natomiast w większych prowadzi do zaburzeń funkcjonowania komórki, a następnie do jej śmierci (3).

Wiele badań naukowych wykazało, że miedź posiada właściwości bakteriobójcze oraz bakteriostatyczne (15). Hamuje rozwój chorobotwórczych mikroorganizmów, które w wyniku namnażania się i rozprzestrzeniania się mogą powodować skażenie środowiska. Międzynarodowe Stowarzyszenie Miedzi (ICA – International Copper Association) stworzyło markę, znak usług oraz symbol certyfikacji. Symbol miedzi przeciwdrobnoustrojowej gwarantuje jakość i odpowiedzialność za stopy miedzi przeciwdrobnoustrojowej przeznaczonej do stosowania w placówkach opieki zdrowotnej. Ponad 450 stopów miedzi jest zatwierdzonych przez Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska (EPA- *Environmental Protection Agency*) z których wytwarzane są certyfikowane produkty z Cu⁺. W związku z tym, USA wprowadziło na swój rynek ponad 275 produktów wykonanych z miedzi, mosiądzu i brązu (16, 9).

Miedź stopowa jest stopem miedzi wówczas, gdy występuje w nim jako podstawowy składnik oraz zawiera niewielką ilość pierwiastków stopowych (poniżej 2%). Należą do nich najczęściej: arsen, fosfor, cyna, chrom, nikiel, mangan, kadm, cyrkon, tellur, krzem, srebro, złoto. Stopy miedzi, takie jak mosiądz i brąz, są jednym z najczęściej wykorzystywanych materiałów konstrukcyjnych. Mosiądz powstaje z połączenia miedzi z cynkiem, jest wytrzymała oraz odporna na korozję. Natomiast brąz powstaje z połączenia miedzi z cyną i fosforem, który gwarantuje jego twardość. Tworzywa z mosiądzu i brązu występują w szerokiej gamie kolorystycznej, od koloru złota i srebra, po brąz i odcienie koloru miedzi (8, 14). Stopy miedzi wykazują dużą wytrzymałość, plastyczność i zdolność do ponownego przetworzenia (4). Są odporne na działanie środków dezynfekcyjnych stosowanych w szpitalach (12).

Tabela I. Mikroorganizmy, na które oddziałuje miedź przeciwdrobnoustrojowa (4).

Bakterie Gram-ujemne	Bakterie Gram dodatnie	Wirusy	Grzyby
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Adenowirus</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Norowirus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Poliowirus</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Camphylobacter jejuni</i>		
<i>Legnionella pneumophila</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
<i>Enterobacter aerogenes</i>			

Wykazano, że zarówno czysta miedź jak i jej stopy wykazują działanie przeciwdrobnoustrojowe. Czym wyższa zawartość procentowa miedzi (>60%) w stopie, tym działanie przeciwdrobnoustrojowe jest efektywniejsze. Na aktywność miedzi wpływa wiele czynników, takich jak: temperatura, wilgotność powietrza, czas działania oraz rodzaj mikroorganizmów z którymi ma ona kontakt (5).

WŁAŚCIWOŚCI MIEDZI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ

Miedź ze względu na swoje właściwości przeciwdrobnoustrojowe wykorzystywana jest przez producentów sprzętu i artykułów medycznych. Czysta miedź wykazuje trwałe działanie przeciwdrobnoustrojowe a przedmioty z niej wykonane nie tracą swoich właściwości przez cały okres użytkowania. Przedmioty wykonane z miedzi mogą podlegać recyklingowi. Po ich przeróbce mogą być ponownie wykorzystane, a miedź nie traci swoich właściwości bakteriobójczych (17).

Miedź przeciwdrobnoustrojowa, oznaczona symbolem (Cu^+), stosowana jest do pokrywania powierzchni różnych elementów (np. klamek czy poręczy) często dotykanych przez ludzi w szpitalach i przychodniach. Według badań przeprowadzonych przez Amerykańską Agencję Ochrony Środowiska stopy miedzi o zawartości co najmniej 65% miedzi przeciwdrobnoustrojowej eliminują 99,9% bakterii. Redukcja mikroorganizmów po kontakcie z powierzchnią miedzianą wyrażona w dziesiętnej skali logarytmicznej wynosiła 7-8. Po przedłużonej inkubacji nie odnotowuje się już żadnych żywych organizmów na powierzchni z miedzi (5). Co istotne, elementy wykonane z miedzi przeciwdrobnoustrojowej w wyniku użytkowania, ścierania, zawilgocenia, utlenienia itp. nie tracą swoich właściwości. Aby powierzchnie te zachowały swoje właściwości jak najdłużej, nie należy powlekać ich jakimikolwiek farbami, olejami, woskami czy emaliami (8).

Na Uniwersytecie w Bonn, na zlecenie Instytutu Miedzi w Niemczech, przeprowadzono badania przeciwdrobnoustrojowej skuteczności stopu o zawartości miedzi powyżej 70% oraz stali szlachetnej. Na powierzchnie testowanych stopów nanoszono zawiesinę szczepu *S. aureus* ATCC 6538 a następnie określano stopień redukcji drobnoustrojów. Wyniki badań wykazały, że powierzchnie pokryte stopem miedzi o zawartości powyżej 70% w dużym stopniu zredukowały liczebność bakterii natomiast powierzchnie pokryte stalą szlachetną nie ograniczały liczby bakterii (5).

Podobne wyniki badań uzyskano na Uniwersytecie Southampton w Wielkiej Brytanii. Drobnoustroje naniesione na powierzchnie ze stali szlachetnej wykazywały większą aktywność i przetrwały na nich wiele dni natomiast na powierzchniach wykonanych z czystej miedzi wykazały mniejszą aktywność a ich liczba uległa znacznej redukcji (13).

MECHANIZM DZIAŁANIA MIEDZI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ

Miedź swoje przeciwbakteryjne działanie zawdzięcza wysokiemu potencjałowi elektrochemicznemu czyli łatwej zdolności do oddawania i przyjmowania elektronów (9). Jony Cu^{2+} oddają elektrony, czyli redukują się, natomiast jony Cu^{1+} przylłączają elektrony, czyli ulegają utlenieniu. Mikroorganizmy wykorzystują enzymy zawierające miedź do wielu procesów życiowych i reakcji chemicznych. Kontakt bakterii z miedzią jest dwuetapowy. W pierwszym etapie miedź wchodzi w reakcje z lipidami, utleniając je i otwierając kanały w błonie komórkowej. Powoduje to szybki spadek integralności błony komórkowej, następnie jej pęknięcie i wypłynięcie na zewnątrz substancji wewnątrzkomórkowych np. jonów potasu (2, 10). W drugim etapie, jony miedzi przenikają do komórek bakterii i uszkadzają kwasy nukleinowe co prowadzi do zaburzenia struktury helikalnej i denaturacji DNA (3). W wyniku reakcji redoks powstaje reaktywny rodnik hydroksylowy (OH^\cdot), który

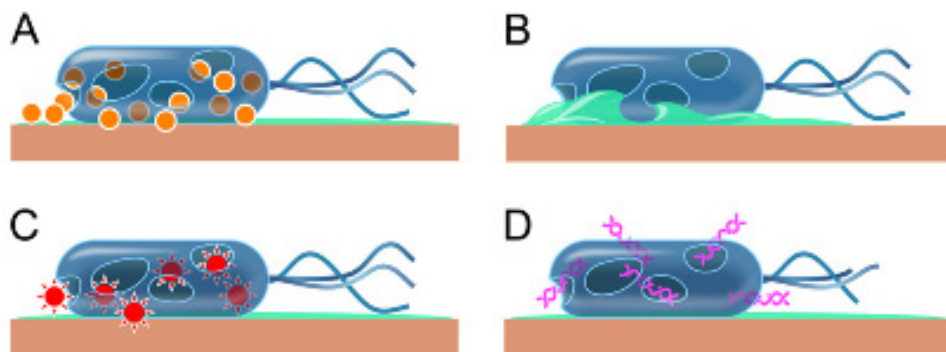
silnie wpływa na DNA oraz zaburza proces metaboliczny białek, lipidów, proces oddychania i prowadzi do obumierania komórki, a w konsekwencji do jej rozpadu (9). Jony miedzi mogą również zespalać informacyjny RNA i w ten sposób dezaktywować wirusy (9).

Autorzy wielu publikacji na przestrzeni lat 80'tych przedstawili badania w których wykazali przeciwbakteryjne mechanizmy miedzi zachodzące na płaszczyźnie wewnątrzkomórkowej oraz przestrzeni międzykomórkowej, potwierdzając, że miedź wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe, np. chelatuje białka poprzez łączenie się z białkowymi grupami karboksylowymi i aminowymi. Miedź może także zaburzać strukturę i funkcję enzymów poprzez wiązanie się z grupą tiolową lub innymi grupami cząsteczek oraz wchodzić w reakcje z lipidami powodując ich utlenienie i otwierając kanały w błonie komórkowej, obniżając tym samym poziom integralności komórki. Kompleksy miedzi tworzą rodniki, które inaktywują wirusy (10).

MATERIAŁY WYKONYWANE Z MIEDZI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ

Obecnie ze stopów miedzi wykonywana jest szeroka gama produktów, które w skuteczny sposób eliminują bądź ograniczają rozprzestrzenianie się mikroorganizmów. Należą do nich: klamki, uchwyty, gałki do drzwi, uchwyty od łóżek pacjentów, szafek, szuflad, krzeseł, stolików zabiegowych, łóżkowych, armatura, toalety, stojaki na kroplówki, umywalki, dozowniki płynów do higienicznego mycia rąk, wózki, gniazda elektryczne, włączniki światła w pomieszczeniach opieki zdrowotnej, akcesoria komputerowe, urządzenia do wprowadzania danych, kosze na śmieci, krzesła dla gości.

Stopy miedzi można wykorzystać nie tylko do pokrywania powierzchni elementów wyposażenia szpitalnego ale także przy projektowaniu systemów wentylacyjno-klimatyzacyjnych w celu zapewnienia odpowiedniej jakości powietrza w pomieszczeniach pacjentów, zwłaszcza na salach operacyjnych (3).



Ryc. 1. Etapy uszkodzenia komórki bakteryjnej przez jony miedzi. A – rozpuszczenie błony zewnętrznej bakterii, B – uszkodzenie błony zewnętrznej komórki bakteryjnej, C – jony miedzi indukują generowanie reaktywnych form tlenu, D – DNA genomowe i plazmidowe ulega degradacji (3)

PRAKTYCZNE WYKORZYSTANIE MIEDZI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ W SŁUŻBIE ZDROWIA NA ŚWIECIE I W POLSCE

Zastosowanie miedzi przeciwdrobnoustrojowej jako składnika licznych stopów wykorzystywanych w placówkach medycznych umożliwia ograniczenie rozprzestrzeniania się zakażeń szpitalnych (6). Według oficjalnych statystyk, w krajach rozwiniętych 5 - 10 pacjentów na 100 przyjętych do szpitali jest zakażonych różnymi drobnoustrojami (1).

Tabela II. Przykładowe porównanie redukcji liczby bakterii (w CFU/ml) wg wyników badań przeprowadzonych w szpitalu Selly Oak w Wielkiej Brytanii (1).

Mikroorganizmy	Redukcja log (CFU/ml) na miedzi	Redukcja log (CFU/ml) na stali szlachetnej
<i>E. coli</i> (ESBL)	> 5	0
<i>S. aureus</i> (MSSA)	> 5	0
<i>E. faecium</i>	3,7	0
<i>C. albicans</i>	> 5	0
<i>K. pneumoniae</i>	> 5	0
<i>A. baumannii</i>	> 4,1	0

Wyniki badań prowadzonych w szpitalach wykazały, że 75% pracowników służby zdrowia nie myje rąk wystarczająco często i dokładnie aby zapobiec rozprzestrzenianiu się chorobotwórczych drobnoustrojów (14). Z tego powodu, w celu przeciwdziałania zakażeniom szpitalnym, WHO wprowadziło kampanię promującą higienę rąk.

Według wyników badań przeprowadzonych w USA, 35-80% przypadków bakteryjnych zakażeń pacjentów jest wynikiem powikłań po pobycie w szpitalu (13). Aby znaleźć rozwiązanie tego problemu i ograniczyć rozprzestrzenianie się mikroorganizmów, przeprowadzono badania w Wielkiej Brytanii, Stanach Zjednoczonych oraz Chile nad wykorzystaniem powierzchni wykonanych ze stopów miedzi przeciwdrobnoustrojowej. Okazało się, że zastosowanie tych powierzchni umożliwiło redukcję liczby mikroorganizmów o 90%. Wyniki te skłoniły środowisko medyczne do wprowadzania miedzianych powierzchni dotykowych w szpitalach, między innymi w Niemczech, Polsce, Japonii, USA i Finlandii jako skuteczny środek zapobiegania rozprzestrzenianiu się infekcji (13).

Według wielu kompleksowych badań prowadzonych od kilku lat w ośrodkach naukowych w Stanach Zjednoczonych, stosowanie powierzchni miedzianych w pomieszczeniach oddziału intensywnej opieki medycznej obniża ryzyko zakażeń szpitalnych o około 40% (18). Stwierdzono, że głównym źródłem zakażeń są: poręcze, stoliki, krzesła, przyciski przywoływania pielęgniarstwa, uchwyty drzwi. Zdecydowano wymienić różne powierzchnie dotykowe na miedziane, m.in.: poręcze łóżek, stoliki przyłóżkowe, przyciski do wzywania pielęgniarstwa, stojaki do kroplówek. Zastosowanie tych elementów w pomieszczeniach poskutkowało obniżeniem liczebności mikroorganizmów na badanych powierzchniach (7).

Po pojawieniu się najnowszych wyników badań naukowych pokazujących, że stosowanie elementów wyposażenia z miedzi przeciwdrobnoustrojowej może skutecznie ograniczyć rozprzestrzenianie się mikroorganizmów chorobotwórczych w szpitalach i placówkach medycznych zaczęto je wprowadzać i wymieniać na całym świecie. Najczęstszymi

elementami wyposażenia szpitalnego były: klamki, uchwyty, stojaki na kropłówkę, poręcze łóżek, poręcze w łazienkach, pod prysznicami i w toaletach, deski klozetowe i spłuczki, siedzenia pod prysznicem, maty antypoślizgowe w łazience, wózki na leki, włączniki światel, krany oraz długopisy kulkowe (1).

W Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu wprowadzono na oddziale nefrologicznym, w pododdziałach diabetologicznym i transplantologicznym miedziane elementy m.in. w drzwiach - klamki i uchwyty do popychania drzwi, miedziane stojaki na kropłówkę, poręcze łóżek, poręcze w łazienkach, pod prysznicami i w toaletach, deski klozetowe i spłuczki, siedzenia pod prysznicem, maty antypoślizgowe w łazience, wózki na leki, włączniki światel oraz długopisy kulkowe (1).

Elementy wyposażenia wykonane z miedzi przeciwdrobnoustrojowej wprowadziły także inne szpitale w Polsce, takie jak: Zachodniopomorskie Centrum Onkologii w Szczecinie, Szpital w Ostrowie Wielkopolskim, Szpitale Tczewskie, Szpital Praski p.w. Przemienienia Pańskiego w Warszawie, PAKS Kliniki Serca w Wodzisławiu Śląskim, Siódmy Szpital Marynarki Wojennej w Gdańsku, SP ZOZ w Kolbuszowej i Międzyrzeczu (18). Wszystkie miedziane produkty są oznakowane symbolem „Cu⁺” potwierdzającym, że użyte stopy redukują mikroorganizmy.

PODSUMOWANIE

Wiele naukowych badań poświęconych miedzi przeciwdrobnoustrojowej przeprowadzonych w placówkach medycznych wykazało, że może być ona z powodzeniem wykorzystywana do ograniczania liczebności mikroorganizmów na powierzchniach z którymi ma kontakt personel i pacjenci, przyczyniając się tym do ograniczenia występowania zakażeń szpitalnych.

Wyposażenie placówek opieki zdrowotnej w przedmioty o powierzchni z miedzi przeciwdrobnoustrojowej jest korzystne z ekonomicznego punktu widzenia, gdyż w porównaniu do kosztów leczenia zakażeń szpitalnych, koszt materiału oraz utrzymania i konserwacji powierzchni miedzianych jest niski, a czas ich eksploatacji nieograniczony.

PIŚMIENNICTWO

1. Antimicrobial Copper. Wykorzystanie Miedzi przeciwdrobnoustrojowej. Praktyczne zastosowania-służba zdrowia. Publikacja CDA. Polskie Centrum Promocji Miedzi 2012.
2. Borkow G, Gabbay J. Copper as Biocidal Tool. *Current Medical Chemistry* 2005; 12: 2163
3. Borkow G, Gabbay J. Copper, an ancient remedy returning to fight microbial, fungal and viral infections. *Current Chemical Biology* 2009; 3: 272-8.
4. Brymora K. Historia jednego surowca. Miedź. *Logistyka odzysku* 2016; 2: 60-2.
5. Bryony S. Lower infection rates through copper surfaces. *Health Business*. 2014.
6. Bryony S. The Hygienic Properties of Antimicrobial Copper. *Fm World* 2015; 34
7. <https://www.antimicrobialcopper.org/sites/default/files/upload/media-library/files/pdfs/uk/articles/bbh-special-report-2012.pdf>

8. *Dobrzański LA*. Struktura, własności i zastosowanie stopów miedzi. Instytut Materiałów Inżynierskich i Biomedycznych 2007.
9. *Grass G, Rensing C, Solioz M*. Metallic Copper as an Antimicrobial Surface. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 5.
10. *Lewis Al, Keevil CW*. Przeciwbakteryjne właściwości miedzi i jej stopów w systemach HVAC&R. International Copper Association 2004.
11. *Michels HT, Michels CA*. Potential of copper alloys to kill bacteria and reduce hospital infection rates. *Inter Med Rev* 2017; 3: 1-16.
12. <http://doktorb.pl/miedz-kontra-drobnoustroje-dlaczego-szpitala-nia-postawic/>
13. <https://www.antimicrobialcopper.org/pl/dowody-naukowe?page=1>
14. *Oko M*. Antimicrobial copper surfaces. *Hospital health care* 2015; 135-8.
15. *Santo ChE, Quaranta D, Grass G*. Antimicrobial metallic copper surface kill *Staphylococcus haemolyticus* via membrane damage. *Microbiol Open* 2012; 1: 46-52.
16. *Szufranowski K*. Miedź, jej działanie przeciwdrobnoustrojowe. Higiena w placówkach opieki medycznej, Verlag Dashöfer, Warszawa 2012; 1-8
17. *Warnes SL, and and Keevil CW*. Mechanism of copper surface toxicity in vancomycin-resistant. *Enterococci* following or dry surface contact. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 6049-59.
18. *Ziemba B, Jakimiak B, Chojecka A i inni*. Działanie przeciwdrobnoustrojowe metali. *Zakażenia* 2013; 13: 52-6.

Otrzymano: 13 XI 2017 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Wspomnienia ze 100 lat historii laboratorium
bakteriologicznego w Państwowym Zakładzie Higieny.
Jego pracownicy oraz rola jaką odegrali w opanowywaniu epidemii
i w ochronie zdrowia ludności Polski

Memories from 100 years of history of the bacteriological
laboratory at the National Institute of Hygiene.
His employees and the role they played in controlling the epidemic
and protecting the health of the Polish population

Hanna Stypulkowska-Misiurewicz

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego-Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

„Idąc drogą wspomnij tych, którzy nią szli przed tobą”
Cyt wg L.Wolanowski: Upał i gorączka

Artykuł zawiera wybrane informacje o ludziach oraz ich działaniach związanych z prowadzonymi w PZH już od 100 lat badaniami bakteriologicznymi. Opisano wyzwania jakie w owym czasie były niezbędne dla ochrony ludności przed epidemiami chorób zakaźnych szerzących się w społeczeństwie, które na skutek wojen straciło poziom materialny i było niezdolne do stosowania się do wymogów higieny.

Słowa kluczowe: *bakteriolodzy w PZH, epidemiczne choroby zakaźne*

ABSTRACT

The aim of this study was to remember the activity of the some chosen microbiologists working in the Bacteriological Department of the National Institute of Hygiene (NIH) in Warsaw, who diagnosed the infectious agents of several epidemics that during last century devastated the population. The work describe the dramatic epidemiological situation in the time when independent State of Poland emerged. And evolution the activity during the whole century depending on changing epidemiological situation of the country and the changes in the administration depending on political situation.

Key words: *microbiologists in NIH, epidemic infectious diseases*

WPROWADZENIE

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego - Państwowy Zakład Higieny obchodzi w bieżącym roku jubileusz 100-lecia swego istnienia - jest najstarszym instytutem Ministerstwa Zdrowia w Polsce. Od początku istnienia instytutu istotnym elementem jego działalności było laboratorium bakteriologiczne.

SYTUACJA SANITARNO-EPIDEMIOLOGICZNA W POLSCE 100 LAT TEMU

Pod koniec XIX wieku rozwinięto wiedzę o mikroorganizmach w otoczeniu człowieka i ich roli w powodowaniu zachorowań na choroby zakaźne. Wykazano, że zakażenie przenosi się z człowieka na człowieka nie tylko przez chorych, ale również przez ozdrowieńców i zdrowych nosicieli chorobotwórczych zarazków. Skoro instytut został założony dla przeciwdziałania dramatycznej sytuacji sanitarno-epidemiologicznej w kraju u zarania jego niepodległości, laboratorium mikrobiologiczne było niezbędnym narzędziem działania.

Ten ekstremalnie trudny element naszej historii warto przypomnieć. Ważne było nie tylko bohaterstwo żołnierzy i radosna euforia, które przyczyniły się do odzyskania niepodległości kraju, ale również działania chroniące ludność od klęski chorób epidemicznych.

Jedenastego listopada 2018 roku Polska formalnie odzyskała państwowość po prawie półtora wieku niewoli, ale mało kto dziś pamięta, w jakim stanie był to kraj, jak bardzo był zrujnowany. Panował powszechny głód a ludność była dziesiątkowana przez działania wojenne i towarzyszące im choroby, m.in. grypę hiszpankę, dur plamisty, czerwone i inne choroby zakaźne (13). Sanitarna sytuacja w Galicji i na terenach byłego zaboru rosyjskiego była tragiczna (2). Nie istniał system ochrony wód oraz usuwania ludzkich odchodów. Brak było wiedzy o zasadach higieny. Jak poważna była sytuacja epidemiologiczna świadczą liczby przypadków zachorowań, a należy przypuszczać, że nie wszyscy chorzy byli rejestrowani. W latach 1919-20 zarejestrowano na terenie Polski 387 tysięcy zachorowań i 41 216 zgonów na dur plamisty, którego pandemia objęła głównie Rosję i Ukrainę. W ciągu tylko czterech lat odnotowano 85 000 zachorowań oraz 7 tysięcy zgonów na dur brzuszny. Podobnie, w latach 1919-1922, zarejestrowano 85 tysięcy zachorowań na czerwonkę, z czego 13 tysięcy zakończyło się śmiercią. W samej tylko Galicji w 1915 roku wystąpiło 29924 zachorowań i 17619 zgonów na cholere (4). Występowały nawet zachorowania na ospę prawdziwą, które kończyły się w 100% zgonem jeżeli wystąpiły w postaci krwiotocznej. Do powszechnie występujących chorób należała gruźlica oraz choroby weneryczne. Trzeba mieć na uwadze, że wszystkie podane liczby dotyczą zachorowań rozpoznanych i zarejestrowanych - ile ich było naprawdę, nikt nie wie.

ROK 1918 - POCZĄTKI BAKTERIOLOGII W PZH

Należy podkreślić, że jedną z pierwszych decyzji Rządu Polskiego było powołanie na stanowisko Ministra Zdrowia dr Witolda Chodźko (1875-1954) oraz Państwowego Centralnego Zakładu Epidemiologicznego (10). Wprowadzono kordon sanitarny na pograniczu z Rosją, na terenie której panowała cholera i wybuchła pandemia duru wysypkowego (11). Kordon został zdemolowany w 1920 roku przez nacierającą armię radziecką i ponownie zorganizowany po jej wycofaniu się. Chronił Polskę, ale i Europę Zachodnią, przed zawleczeniem epidemicznych (kwarantannowych) chorób zakaźnych (2).

Dr Witold Chodźko, został organizatorem, a później Dyrektorem Państwowej Szkoły Higieny (PSH). Niezwykle aktywny po Drugiej Wojnie Światowej, był również założycielem Instytutu Medycyny Wsi w Lublinie (12).

Państwowy Centralny Zakład Epidemiologiczny (PCZE) umieszczono w budynku przy ulicy Langnerowskiej (dziś Chocimskiej) w budynku po strzelnicy zwanym Ciglerówką. Dr Stanisław Sierakowski (1889-1948), bakteriolog, były pracownik laboratorium w Krakowie w którym produkowano szczepionki, uczeń prof. Odo Bujwida (3), został pierwszym kierownikiem laboratorium bakteriologicznego. Minister Zdrowia powołał przybyłego z Londynu dr Ludwika Rajchmana (1881-1954) na stanowisko dyrektora PCZE. Wspólnie z lekarzem powiatowym, dr Czesławem Wroczyńskim (1889-1940 w Katyniu) zgromadził sprzęt laboratoryjny pozostawiony w Polsce przez wycofujące się armie (8). Sprzęt ten wykorzystano do wyposażenia pierwszej pracowni diagnostycznej tworzonego PCZE. Pierwszymi pracownikami PCZE byli lekarze powracający z frontu, między innymi epidemiolog, dr Feliks Przesmycki (1892-1974). Po otrzymaniu stypendium Fundacji Rockefellera, dr S. Sierakowski odbył staże w USA, a po powrocie podjął pracę na Uniwersytecie Warszawskim. Również lekarz bakteriolog, dr Józef Celarek (1886-1952), który początkowo był oddelegowany z wojska do produkcji szczepionek przeciw cholerze i durowi brzusznemu w pracowni Odo Bujwida (3), w PCZE objął zakład produkujący szczepionki przeciw cholerze, czerwonce i durowi brzusznemu a w końcu lat dwudziestych również produkujący insulinę (2, 8).

W latach 20-tych nastąpiła rozbudowa Zakładu. Bakteriologiczną pracownię diagnostyczną przeniesiono z budynku zw. Ciglerówką, znajdującego się w narożniku ulicy, do specjalnie zaadaptowanych pomieszczeń w willi znajdującej się w głębi podwórza, zakupionej przez Ministerstwo Zdrowia, aktualnie oznaczonej jako budynek AB. Powracający z frontu na Bałkanach doc. Ludwik Hirszfild (1884-1954) został zaangażowany na stanowisko kierownika Zakładu Badania Surowic i Szczepionek w latach 1921-1927 (8).

W dniu 7 września 1923 roku, Rozporządzeniem Prezydenta RP, Państwowy Centralny Zakład Epidemiologiczny (PCZE) został przemianowany w Państwowy Zakład Higieny (PZH).(6)

W 1926 roku oficjalnie otwarto Państwową Szkołę Higieny (PSH) (6). W dobie przed antybiotykowej, szczepionki uodporniające, surowice lecznicze, kwarantanny a zwłaszcza rygorystyczne stosowanie zasad higieny i dezynfekcja były najważniejszymi sposobami powstrzymania szerzących się zachorowań. Zadaniem PZH było rozpoznawanie chorób zakaźnych i epidemicznych, badanie ich czynników, monitorowanie sytuacji epidemiologicznej, sposobów zwalczania i zapobieganie szerzeniu się zachorowań, produkcja surowic leczniczych i szczepionek uodporniających, w tym m.in. przeciwko ospie prawdziwej (czarnej) t.zw. krowianki. Placówka działała tak sprawnie, że wciągu kilku lat na zlecenie Ligi Narodów polskie szczepionki trafiły m. in. do Grecji i Rosji(11) a insulina nawet do Szwecji.

W 1927 roku, utworzono w PZH Dział Bakteriologii i Medycyny Doświadczalnej, który objął Dr Ludwik Hirszfild, docent Uniwersytetu w Zurychu, immunolog, odkrywca grupowych antygenów krwinek czerwonych. W ramach tego działu funkcjonował Zakład Badania Surowic i Szczepionek, stosujący międzynarodowe sposoby miareczkowania surowic uzyskane od Madsena. Początkowo Państwowy Zakład kontrolował produkowane w PZH i przez prywatne wytwórnie preparaty. O tym, czym zajmowali się pracownicy zakładu można czytać we wspomnieniach L. Hirszfelda (8), opracowaniach M. Gromulskiej (6) a również we wspomnieniach K. Lachowicza.

Jednym z zadań zakładu, którym zajmował się L. Hirszfeld, było szkolenie kadr dla służby sanitarnej kraju. Już w roku 1927 roku, F. Przesmycki, poparty przez L. Hirszfelda, wydał „Zarys Bakteriologii Praktycznej” oparty na szczegółowych własnych notatkach przygotowywanych w związku z prowadzeniem zajęć laboratoryjnych z praktycznej diagnostyki bakteriologicznej. Podręcznik doczekał się 4 wydań, stale uzupełnianych o nowe osiągnięcia metodyczne, w tym dwóch ostatnich już po II-ej Wojnie Światowej (14).

Do Działu Bakteriologii w charakterze epidemiologów angażowano młodych lekarzy którzy ukończyli Szkołę Sanitarnych Podoficerów Rezerwy w Zamku Ujazdowskim. Ich zadaniem było pobieranie w terenie i dostarczanie do laboratorium próbek od osób chorych podczas epidemii chorób zakaźnych występujących w kraju. Wkrótce, w latach trzydziestych, organizowali oni nowe placówki terenowe, które kierowane przez centralę, pełniły rolę filii PZH w terenie prowadząc badania diagnostyczne, nadzór nad żywnością i wodą (7).

PRZYGOTOWANIA DO WOJNY I OKRES OKUPACJI NIEMIECKIEJ

W latach trzydziestych PZH był przygotowywany do działania w okresie spodziewanej wojny i różnych awarii: doprowadzono zaopatrzenie w wodę z położonej na terenie ogrodu studni głębinowej, zainstalowano dynamo zaopatrujące w energię elektryczną PZH i sąsiadujący przy ul. Chocimskiej Nr 5 szpital zakaźny, pracownie bakteriologiczne były zaopatrzone w palniki spirytusowe do opalania ez. We wrześniu 1939 r. otrzymano rozkaz ewakuacji PZH na wschód. Dr H. Mosing i E. Mikołajczyk z wyposażeniem pracowni produkującej szczepionkę przeciw durowi plamistemu dotarli do Wyszkowa a prof. F. Przesmycki do filii PZH w Łucku. Inwazja sowiecka spowodowała, że dr H. Mosing udał się do Lwowa do pracowni dr Weigla.(1) Pozostali powrócili do Warszawy do budynków PZH uszkodzonych wybuchami niemieckich bomb lotniczych (7).

Okupant niemiecki utrzymał działalność PZH dla jego roli w zwalczaniu epidemii. Pod kierownictwem przysłanego z Hamburga niemieckiego dyrektora, który kontrolował m.in. produkcję szczepionki przeciw durowi plamistemu, przeznaczonej wyłącznie dla potrzeb wojska i ludności niemieckiej. W ramach działalności podziemnej pewną ilość szczepionki produkowano w innym budynku, potajemnie dla lekarzy polskich i dla ludności zamkniętej w getcie warszawskim. Z PZH zostali usunięci doświadczeni pracownicy uznani za osoby pochodzenia żydowskiego, tym również L. Hirszfeld, pomimo jego międzynarodowego znaczenia. Wszyscy wraz z rodzinami zostali zamknięci w dzielnicach wydzielonego zamkniętego miasta i prawie wszyscy tam zginęli. W centrali PZH, oprócz pozostających dawnych pracowników, zatrudniano również osoby z byłych filii PZH na terenach, które zostały poza granicami utworzonej jednostki administracyjnej Generalnego Gubernatorstwa (dr Adamski, Walecki i inni). Pozostała na stanowisku dr Julia Seydel, która pomimo niemieckiego pochodzenia nie podpisała listy volksdeutscha. Niektórzy przybyli uzyskiwali początkowo status karmiciela wszy (np. J. Kostrzewski), później znajdowali zatrudnienie w kolumnach sanitarnych wyjeżdżających do ognisk epidemicznych. Ich zadaniem było m.in. pobieranie i dostarczanie materiału do diagnostycznych badań bakteriologicznych. W pracowniach m.in. potajemnie szkolono lekarzy ze Szkoły Zaorskiego, podziemnego wydziału lekarskiego Uniwersytetu Warszawskiego

Upadek Powstania Warszawskiego spowodował przymusową ewakuację ocalałych w gmachu pracowników i wywiezienie do Wrocławia części wyposażenia laboratoryjnego.

ZAKŁAD BAKTERIOLOGII PZH W PIERWSZYCH LATACH POWOJENNYCH

Po przeniesieniu PZH w latach 1945-50 z Warszawy do Łodzi, Zakład Bakteriologii kierowany był przez doc. F. Przesmyckiego (do czasu utworzenia osobnego Zakładu Wirusologii). W latach 1950-56 funkcje kierownika Zakładu pełnił E. Wojciechowski.

Działania wojenne w latach 1939-1945, głód i przemieszczanie ludności wysiedlanej przez okupantów i uciekającej przed represjami, a także powojenna zmiana granic Polski, przyczyniły się do ponownego znacznego wzrostu liczby zachorowań na epidemiczne bakteryjne choroby zakaźne. Pracownicy Zakładu Bakteriologii PZH byli zaangażowani w rozpoznawanie czynników bakteryjnych u chorych, diagnozowanie nosicieli chorobotwórczych zarazków oraz wskazywanie możliwości działań zapobiegających szerzeniu się epidemii. Pełnili nadzór merytoryczny nad laboratoriami filii PZH, a od 1953 r. nad 150 pracownikami bakteriologicznymi Wojewódzkich i Powiatowych Stacji Sanitarno-Epidemiologicznych. Nadzór, finansowany ze środków Ministerstwa Zdrowia, czyli budżetu Państwa, polegał na szkoleniu pracowników Stacji Sanitarno-Epidemiologicznych w PZH jak również na delegowaniu pracowników PZH w teren. Umożliwiała to merytoryczny wgląd w epidemiologiczną sytuację w kraju i skuteczne przeciwdziałanie niedociągnięciom lub wręcz brakom w wyposażeniu, szczególnie w przypadkach ognisk epidemicznych. W laboratoriach terenowych badano próbki materiału klinicznego od chorych, również w przypadku zakażeń jelitowych od ozdrowieńców, nosicieli zarazków chorobotwórczych i osób przystępujących do pracy przy żywności i przy opiece nad dziećmi.

W 1957 roku produkcja szczepionek i surowic została przeniesiona z PZH do utworzonego zakładu produkcyjnego Wytwórni Surowic i Szczepionek „Biomed”. Kierował nią długoletni pracownik PZH, dr Stanisław Sasaki (12). W laboratorium wytwórni byli zatrudnieni dodatkowo doświadczeni pracownicy Zakładu Bakteriologii PZH, którzy dostarczali wyizolowane od chorych i skontrolowane bakteryjne szczepy stosowane do produkcji szczepionek.

Z Zakładu Bakteriologii wydzielono także Zakład Kontroli Surowic i Szczepionek, którego kierownictwo objął ewakuowany ze Lwowa prof. H. Meisel.(12)

ZAKŁAD BAKTERIOLOGII W LATACH 1957-77

Przed ponad półwiekiem podjęłam pracę w Zakładzie Bakteriologii, bezpośrednio po studiach medycznych, mając zalecenie uzyskanie specjalizacji z mikrobiologii lekarskiej. Był to okres kiedy po latach izolacji kraju z powodu wojny i powstania żelaznej kurtyny odczuwało się brak wiedzy o postępach w nauce jaki uczyniono w krajach zachodnich. W roku 1957 uzyskano stypendia ze Światowej Organizacji Zdrowia i zgodę by wybrani fachowi pracownicy PZH mogli odbyć staże szkoleniowe w instytucjach europejskich i USA, Wyjechali m.in. K. Lachowicz i J. Kostrzewski, co zaowocowało ich późniejszymi międzynarodowymi kontaktami. Zakład Bakteriologii PZH pełnił funkcję diagnostyczną i naukową, obejmując badaniami wiele etiologicznych czynników chorób zakaźnych oraz szkoleniową dla pracowników służby sanitarno-epidemiologicznej. Doświadczeni pracownicy Zakładu Bakteriologii, docenci E. Wojciechowski, H. Walecki (12), B. Kopacka, oraz Prof. Pakuła, brali czynny udział w kształceniu lekarzy, prowadząc zajęcia laboratoryjne w Zakładzie Mikrobiologii Akademii Medycznej w Warszawie, kierowanym przez przybyłego z armią polską ze Lwowa Prof. Edmunda Mikulaszka. Zakładem Bakteriologii PZH kierował doc.

Sporzyński, który poprzednio zajmował się w PZH produkcją szczepionki przeciw ospie prawdziwej, uzyskiwanej ze zmian skórnych wywoływanych u jałówek t.zw. "krowianki". Jako kierownik Zakładu Bakteriologii w latach 1956-60 umożliwiał znaczną autonomię kierownikom poszczególnych pracowni, których obsadę stanowili zwykle jeszcze przedwojenni pracownicy zakładu. I tak:

1. Dr Anatol Kuźniecowa kierował Pracownią Prątka BCG, w późniejszym okresie, przy pomocy asystentki mgr Krystyny Sitek, produkowali w pracowni również autoszczepionki. Dr Henryk Walecki, po odejściu dr Seydel, kierował Pracownią Diagnostyczną Błonicy i Krztuśca. W pracowni poza prowadzeniem diagnostyki, izolowano szczepy, które przekazywano do Zakładu „Biomed”, gdzie znajdowały zastosowanie do produkcji szczepionek zawierających antygeny szczepów aktualnie krążących w populacji ludzkiej.
2. Dr Jadwiga Górską (Goldberżanka), jak za czasów Hirszfelda,(8) kierowała Pracownią Diagnostyki Bakteriologii Ogólnej.
3. Prof. Pakuła, stosunkowo nowy pracownik, był równocześnie wykładowcą mikrobiologii na wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Warszawie. W pracowni zajmowano się paciorkowcami i gronkowcami, np. dr Cecylia Zak typowaniem bakteriofagowym gronkowców. Oboje wkrótce wyemigrowali „na Zachód”
4. Doc. Kazimierz Lachowicz (10), który po jego odwołaniu z filii PZH w Gdańsku na życzenie wizytatora sowieckiego, po okresie bezrobocia został w 1952 r. zatrudniony w PZH i objął Pracownię *Shigella* oraz chorobotwórczych *Escherichia coli*. Pracownia wkrótce uzyskała status Krajowego Ośrodka Referencyjnego, uznanego przez Światową Organizację Zdrowia. W Pracowni dr Sabina Brandes gromadziła oraz badała chorobotwórczość szczepów zaliczanych do grupy *Alkaescens-Dispar*, przez pewien czas uznawanych za etiologiczny czynnik czerwonki bakteryjnej.
5. Dr Maria Macierewicz po powrocie do PZH kierowała pracownią Pałeczek Jelitowych *Enterobacteriaceae* (12). Początkowo w pracowni m.in. zajmowano się bakteriofagowym typowaniem szczepów *Salmonella Typhi* izolowanych od chorych i nosicieli oraz z żywności. Kiedy pojawił się problem lekoopornych szczepów *S. Enteritidis* dr M. Macierewicz oraz i dr S. Kałużewski, opracowali autorski schemat bakteriofagowego typowania szczepów *S. Enteritidis*, wówczas głównego czynnika zachorowania dzieci hospitalizowanych z objawami biegunki. Schemat ten został wykorzystany w wielu krajach bloku wschodniego, w których panowała podobna epidemia zachorowań wywołanych przez szczepy odporne na antybiotyki. Ponadto, dr S. Kałużewski opracował schemat różnicowania bakterii z rodzaju *Klebsiella*, na odmiany będące zakaźnym czynnikiem biegunek niemowląt, czynnika infekcyjnych chorób dróg oddechowych lub etiologicznym czynnikiem twardzieli czy ozeny.
6. Doc. Bronisława Kopacka kierowała pracownią serologiczną, w której diagnozowano zakażenia pałeczkami duru brzuszego u ludzi. W następnych latach objęła pracownię diagnostyki bakteriologicznej krztuśca i błonicy
7. Doc. Edmund Wojciechowski kierował pracownią duru wysypkowego, w której zajmowano się również diagnostyką innych zakażeń powodowanych przez *Rickettsia*, takich jak papuzica i gorączka Q.

W owym czasie bardzo ważną funkcję spełniała Pracownia Pożywek Bakteriologicznych, w której podłoża bakteriologiczne sporządzano z surowców naturalnych, np. z bulionu mięsnego i podrobów uzyskiwanych z rzeźni, jaj i innych produktów. Pracownia zatrudniała znaczną liczbę osób, w tym techników i pomoce laboratoryjne przyuczone do wykonywania czynności pomocniczych. Pracownią kierowała dr Ewa Janczura, absolwentka Uniwersytetu Lwowskiego, przy współpracy z mgr Heleną Załęską i technikiem Teresą Teysserie, a także zmieniającymi się pracownikami pomocniczymi, zajmującymi się specjalnymi naukowymi tematami. W pracowni tej działali również fachowi pracownicy do obsługi autoklawów do sterylizacji pożywek lub do zabijania materiału zakaźnego. W obrębie pracowni myto i sterylizowano szkło wielokrotnego użycia (pipety, probówki, płytki, kolby, butelki itp.).

Osobną komórkę stanowiła zwierzętarnia, początkowo wspólna dla całego pionu PZH, prowadzona przez Pana Sawickiego jeszcze przedwojennego pracownika, później wydzielona dla Zakładu Bakteriologii (12). Zwierzętarnia dzieliła się na część ogólną i zabudowaną boksami część zakaźną, w której wykonywano testy dotyczące chorobotwórczości wyizolowanych szczepów bakteryjnych oraz produkowano diagnostyczne surowice odpornościowe do oznaczania antygenów, m.in. różnych typów *Shigella*.

Organizacja Zakładu Bakteriologii ulegała zmianom w zależności od aktualnych potrzeb służby sanitarno-epidemiologicznej w związku z sytuacją epidemiologiczną w kraju, a również sytuacją polityczną.

Bakteriami zarodnikującymi zajmowała się Dr Meislowa, kierując również Muzeum Szczepów Bakteryjnych umiejscowionym w Zakładzie Kontroli Surowic i Szczepionek.

Pracownia *Shigella* uzyskała pomieszczenia w przyziemiu, po zlikwidowaniu kierowanego przez doc. J.W. Meduskiego Zakładu Metabolitów Pośrednich. W pracowni, zarejestrowanej w WHO jako Krajowy Ośrodek *Shigella* i *Escherichia coli*, bezpłatnie potwierdzano i serologicznie typowano dla celów epidemiologii szczepy przysyłane z pracowni z całego tereny Polski. Gromadzono dokumentację dotyczącą osób od których je izolowano, a dane analizowano dla celów epidemiologicznych. Wyniki badań publikowano w kraju i zagranicą.

W 1958 roku prof. K. Lachowicz powrócił z rocznego stypendium WHO w laboratoriach krajów Europy i USA przywożąc informacje o postępach w metodyce badań laboratoryjnych i organizacji nadzoru epidemiologicznego. Zacieśniona została współpraca z Zakładem Epidemiologii. Grupa specjalistów bakteriologów w składzie: dr Sabina Brandes, dr Stanisław Kałużewski, dr Maria Macierewicz, pod kierunkiem prof. dr hab. Kazimierza Lachowicza, opracowała 4 zeszyty wytycznych, adaptując do warunków krajowych, metody stosowane w krajach Europy i USA. Metodykę badań, p.t. „Wykrywanie i różnicowanie drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae*” zawarto w 4 zeszytach (16): 1) Klasyfikacja rodziny *Enterobacteriaceae* 2) Wykrywanie i różnicowanie pałeczek *Salmonella* i *Shigella*, opracowana przez M. Macierewicz i S. Brandes, 3) „Wykrywanie i określanie pałeczek okrężnicy” – K. Lachowicz, „Wykrywanie i różnicowanie pałeczek *Klebsiella*” S. Kałużewski, „Wykrywanie i różnicowanie drobnoustrojów w badaniach ogólnych – M. Macierewicz. .: Czwarty zeszyt 4) „Podłoża i odczyn” opracował S. Kałużewski. Zawarł w nim szczegółowe informacje dotyczące receptur przygotowywania podłoży bakteriologicznych do izolowania i namnażania poszukiwanych bakterii chorobotwórczych, wykonywania podłoży do badań biochemicznych właściwości badanych szczepów, ich kontroli oraz oznaczania testów chemicznych i immunologicznych. Publikację wydano jako Wydawnictwa Metodyczne PZH. Metodycę tą wdrożono do stosowania we wszystkich pracowniach bakteriologicznych w kraju a nawet niektórych krajach bloku wschodniego oraz była ona prezentowana na międzynarodowych konferencjach.

Pracownicy Zakładu mieli obowiązek wizytować pracownie stacji sanitarnych powiatowych i wojewódzkich oraz bywali delegowani do pracy w terenie przy rozpoznawaniu etiologii zwalczania epidemii zakażeń pokarmowych, m.in.. w Chełmie Lubelskim zakażenie pochodzenia wodociągowego. W pracach terenowych brali udział epidemiolodzy dr Szmunn i dr Magdzik oraz bakteriolog dr S. Kałużewski i dr H. Stypułkowska.

W latach 1960-77 Zakładem Bakteriologii kierował prof. E. Wojciechowski, a kierownictwo Pracowni *Rickettsii* objął dr Edward Mikołajczyk (10). Ze względu na zapotrzebowanie rozszerzono asortyment badań o diagnostykę nowych chorób zakaźnych, np. papuzicy spowodowanej importem zakażonych ptaków i gorączki Q, spowodowanej importem owiec z Rumunii.

W roku 1964 powstała w PZH nowoutworzona Pracownia Promieniowców kierowana przez prof. W. Kuryłowicza, pełniącego równocześnie funkcję Dyrektora PZH (10). Pracownia zajmowała się badaniami szczepów promieniowców.

W roku 1963 prof. Janusz Jeljaszewicz objął kierownictwo Pracowni Ziarenkowców (10). W ciągu szeregu następnych lat zorganizował 6 konferencji międzynarodowych na temat gronkowców, ich koagulazy i innych metabolitów bakteryjnych. W tych konferencjach brali czynny udział również pracownicy Zakładu Bakteriologii.

Był to okres pewnej „odwilży”. Na staże przyjeżdżali pracownicy laboratoryjni w krajów bloku wschodniego, a nawet z Chin i Wietnamu. W latach 1966-68 prof. K. Lachowicz został delegowany przez ŚOZ na stanowisko konsultanta Ministra Zdrowia Mongolii dla zorganizowania obsługi bakteriologicznej w całym kraju. W latach 1981-83 H. Stypułkowska-Misiurewicz była konsultantem badań laboratoryjnych prowadzonych w ICDDR (International Centre for Diarrhoeal Diseases) w Dhaka, w Bangladeszu.(17)

Prof. Janusz Jeljaszewicz w 1977 roku przejął kierownictwo Zakładu Bakteriologii, a w roku 1980 objął je doc. Stanisław Kałużewski (17) który intensywnie zajął się systematycznym porządkowaniem metodyki badań bakteriologicznych. W wyniku tych działań w roku 1983 pod redakcją S. Kałużewskiego wydano unowocześnioną i ujednoliconą instrukcję metodyczno-organizacyjną dla laboratoriów Stacji Sanitarnej - Epidemiologicznych. Były to materiały z kursu „Unifikacja wybranych metod diagnostyki bakteriologicznej i serologicznej zorganizowanego w PZH w dniach 12-14 stycznia 1982 roku (9). Autorami poszczególnych rozdziałów byli Kierownik Zakładu Bakteriologii, doc. S. Kałużewski oraz kierownicy i asystenci poszczególnych pracowni. Instrukcja obejmowała wszystkie rodzaje bakterii chorobotwórczych, które wtedy należało wykryć i rozpoznać w pracowniach bakteriologicznych Stacji Sanitarnej-Epidemiologicznych w kraju.

Oprócz rutynowych badań wynikających z długoletnich zobowiązań PZH, pracownicy Zakładu Bakteriologii podejmowali dodatkowe zadania związane z wymaganiami aktualnej sytuacji epidemiologicznej w kraju. Przykładem tego był udział we współpracy z epidemiologami w wyjazdach do ognisk epidemicznych obejmujących znaczną liczbę chorych, np. do epidemii czerwoności w Chełmie Lubelskim (W. Magdzik, Szmunn. S.Kałużewski, H. Stypułkowska-Misiurewicz).

NIEOCZEKIWANE NOWE ZADANIA ZAKŁADU BAKTERIOLOGII

Nieoczekiwany, pilnym zadaniem okazała się mikrobiologiczna diagnostyka zakażeń przecinkowcem cholery *Vibrio cholerae*. Ponieważ ostatnie zachorowania na cholere wystąpiły w obozach jeńców sowieckich po inwazji na teren Polski w 1920 r. diagnostyka cho-

lery została zapomniana. W latach 1970-1972 siódma pandemii cholery, tym razem El-Tor, zbliżała się do granic Polski (11). Należało przygotować laboratoria do rozpoznawania od lat niewidzianego u nas patogenu, zabezpieczenia kraju poprzez nowoczesne i wiarygodne badania laboratoryjne ukierunkowane na wykrywanie przecinkowca cholery i jego odmian. Opracowano i powielono nowoczesną instrukcję do badań bakteriologicznych ukierunkowanych na wykrywanie i określanie przecinkowca cholery. W pomieszczeniach pracowni zorganizowano szkolenie w technikach laboratoryjnych niezbędnych do wykrywania i rozpoznawania przecinkowca cholery. W tym okresie wyszkolono delegowanych pracowników z 50 laboratoriów terenowych szkoląc ich w ramach zajęć praktycznych w metodyce badań. Wprowadzono obowiązkowe dostarczanie do PZH szczepów podejrzanych o to, że mogą być *V. cholerae*, wyizolowanych w laboratoriach szpitalnych i stacji sanitarno-epidemiologicznych. W pracowni ponownie badano szczepy w celu potwierdzania ich chorobotwórczości.

W okresie zagrożenia terrorystycznego, prof. S. Kałużewski opracował i prowadził procedury dotyczące sprawdzania pod względem mikrobiologicznym zawartości listów i przesyłek podejrzanych o skażenie zarodnikami bakterii pałeczki wąglika (*Bacillus anthracis*).

Wraz ze zmianą sytuacji epidemiologicznej pojawiły się wyzwania wymagające opracowania metodyki wykrywania i rozpoznawania nowych czynników zachorowań. Na uwagę zasługuje wprowadzenie przez prof. S. Kałużewskiego odczynu wiązania dopełniacza do serodiagnostyki mykopłazmozy, twardzieli i ozeny na terenie Polski. Badania związane z doskonaleniem serodiagnostyki wybranych zakażeń bakteryjnych kontynuowano w kolejnych latach. Zaadaptowano między innymi odczyn immunoenzymatyczny ELISA do serodiagnostyki mykopłazmozy, jersiniozy, salmonelozy, tularemii, twardzieli czy też zakażeń wywoływanych przez werotoksyczne pałeczki *E. coli*. Metody te zostały wdrożone do rutynowej diagnostyki prowadzonej na co dzień w Laboratorium Zakładu Bakteriologii. Na szczególną uwagę zasługuje serodiagnostyka jersiniozy, w której jako antygeny wykorzystano lipopolisacharydy uzyskane z pałeczek *Y. enterocolitica* poszczególnych grup serologicznych uznanych za patogenne dla człowieka. Pozwoliło to, między innymi, na wykrycie w latach 2003-2013 epidemii zakażeń wywoływanych w Polsce przez pałeczki „amerykańskiego” bioserotypu 1B/O8.

W 2003 roku Kierownikiem Zakładu Bakteriologii został prof. Marek Jagielski (17). Pod jego redakcją ukazała się w 2010 roku, w ramach Biblioteki Diagnostyki Laboratoryjnej, książka przeznaczona dla pracowników laboratoriów, p.t. „Etiologia, obraz kliniczny i diagnostyka ostrych zakażeń i zarażeń przewodu pokarmowego oraz zatruc pokarmowych”. W książce przedstawiono aktualną wiedzę niezbędną dla diagnostów prowadzących badania bakteriologiczne i parazytologiczne (5). W związku z reorganizacją służby bakteriologicznej utworzono pracownię przyszpitalne i zlikwidowano pracownię w większości stacji powiatowych. Podlegały one władzom lokalnym, zlikwidowano nadzór centralny. Wydana monografia wpłynęła na ujednolicenie stosowanych w nich metod badawczych.

Aktualnie Zakład Bakteriologii pod kierownictwem dr hab. R. Gierczyńskiego zajmuje się między innymi opracowywaniem i wdrażaniem metod biologii molekularnej do identyfikacji wybranych bakterii chorobotwórczych.(15) Od roku 2018 roku, po zmianach struktury NIZP-PZH, Zakład Bakteriologii zmienił nazwę na Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń Biologicznych. W ramach tego Zakładu działa między innymi Pracownia Serologicznej Diagnostyki Zakażeń Bakteryjnych, kierowana przez prof. dr hab. Waldemara Rastawickiego (17) zajmująca się badaniem odpowiedzi immunologicznej człowieka na wybrane zakażenia bakteriologiczne (15).

W Zakładzie Bakteriologii od samego początku mieści się redakcja kwartalnika *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia*. Kwartalnik ukazuje się od 1923 roku, początkowo pod nazwą „*Medycyna Doświadczalna i Społeczna*”, a od 1949 roku pod aktualną nazwą. Czasopismo zostało powołane w celu umożliwienia publikowania wyników prac polskich naukowców w odrodzonym kraju. W skład pierwszego Komitetu Redakcyjnego weszli między innymi L. Hirszfeld, L. Rajchman, Z. Szymanowski, W. Chodźko, M. Kacprzak czy K. Funk – wybitny polski biochemik, autor terminu „witamina”. Kolejnymi Redaktorami czasopisma byli: prof. W. Kuryłowicz (1949-1951), prof. T. Sporzyński (1952-1956), prof. H. Walecki (1957-1970), prof. E. Wojciechowski (1971-1978), prof. S. Kałużewski (1979-2011), prof. M. Jagielski (2012-2014) i prof. W. Rastawicki (od 2015 do chwili obecnej). W kwartalniku zamieszczane są prace doświadczalne i metodyczne z dziedziny mikrobiologii medycznej w zakresie zakażeń bakteryjnych, wirusowych, grzybiczych i zarażeń pasożytniczych oraz ich oddziaływania na zdrowie publiczne. W szczególności publikowane są prace dotyczące chorobotwórczości drobnoustrojów, ich zróżnicowania, lekooporności i ekologii w aspektach oddziaływań na społeczeństwo, ochronę zdrowia i jej ekonomikę. Publikowane są również prace poglądowe z wyżej wymienionej dziedziny, krótkie komunikaty z prac doświadczalnych oraz komentarze i listy do redakcji.

PIŚMIENNICTWO

1. *Allen A.* Fantastyczne laboratorium doktora Weigla, Lwowscy uczeni, tyfus i walka z Niemcami, przełożyła B. Gadomska, Wydawnictwo Czarne, Wołowiec, 2016.
2. *Balińska M.A.* Ludwik Rajchman życie w służbie ludzkości, przekład na język polski. M. Braunstein, M. Krasicki, Wydawnictwo Studio EMKA, Warszawa, 2012.
3. *Bujwid O.* Osamotnienie, Pamiętniki z lat 1932-1942, Wydawnictwo Literackie, Kraków 1990, s. 261.
4. Choroby zakaźne i ich zwalczanie na ziemiach polskich w XX wieku, praca zbiorowa pod red. J. Kostrzewskiego, W. Magdzika, D. Naruszewicz-Lesiuk; Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001.
5. Etiologia, obraz kliniczny i diagnostyka ostrych zakażeń i zarażeń przewodu pokarmowego oraz zatruc pokarmowych. Red. M. Jagielski, Biblioteka Diagnostyki Laboratoryjnej, fundacja Pro Farmacja Futura, Warszawa, 2010.
6. *Gromulska M.* 75-lecie istnienia Państwowego Zakładu Higieny, *Roczn.PZH*, 1993, XLIV, Nr1, s.1-3.
7. *Gromulska M.* Filie Państwowego Zakładu Higieny. *Przegl Epidemiol* 2008; 62: 705-17.
8. *Hirszfeld L.* Historia Jednego Życia, wyd. Czytelnik, Warszawa, 2000.
9. Instrukcja metodyczno-organizacyjna Zakładu Bakteriologii PZH dla Stacji Sanitarno-epidemiologicznych, red. S. Kałużewski, wyd. Państwowego Zakładu Higieny, Zakładu Bakteriologii, Warszawa, 1983.
10. *Naruszewicz-Lesiuk D.* Rola Państwowego Zakładu Higieny w perspektywie historycznej, *RPZH AW59(Suplement)* 1-92 2008, s. 51-8.
11. *Naruszewicz-Lesiuk D., Stypułkowska-Misiurewicz H.* Epidemie cholery wczoraj i dziś. 100-lecie działalności Państwowego Zakładu Higieny w zwalczaniu i ochronie przed zawleczeniem cholery do kraju. *Przegl Epidemiol* 2017, 71: 661-70.

12. Okna pamięci - sylwetki pracowników Państwowego Zakładu Higieny RPZHAW 59 (Suplement) 1-92, 2008, 69-89.
13. Raport Epidemic Commission of the League of Nations, Sekcja Higieny, Genewa cyt. Wg (2)
14. Przesmycki Feliks: Zarys Bakteriologii Praktycznej, 1927 cyt .wg Czwartego Wydania PZWL, Warszawa 1953.
15. Sprawozdanie z działalności NIZP-PZH w roku 2016, Warszawa 2017.
16. Wykrywanie i Różnicowanie Drobnoustrojów Rodziny Enterobacteriaceae. Red. K. Lachowicz, Wydawnictwa Metodyczne Państwowego Zakładu Higieny rok 1963 zeszyty 1-4.
17. Złota Księga Nauk Medycznych 2010, Wydawnictwo. Polski Instytut Biograficzny, Mastermedia sp.zoo. 2010.

Otrzymano: 26 III 2018 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny.

ZASADY PRZYGOTOWYWANIA ARTYKUŁÓW KIEROWANYCH DO PUBLIKACJI W KWARTALNIKU „MEDYCYNĄ DOŚWIADCZALNA I MIKROBIOLOGIA”

W kwartalniku „Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia” zamieszczane są prace doświadczalne i metodyczne z dziedziny mikrobiologii medycznej w zakresie zakażeń bakteryjnych, wirusowych, grzybiczych i zarażeń pasożytniczych oraz ich oddziaływanie na zdrowie publiczne. W szczególności publikowane są prace dotyczące chorobotwórczości drobnoustrojów, ich zróżnicowania, lekooporności i ekologii w aspektach oddziaływania na społeczeństwo, ochronę zdrowia i jej ekonomikę. Publikowane są również prace poglądowe z wyżej wymienionej dziedziny, krótkie komunikaty z prac doświadczalnych oraz komentarze i listy do redakcji mające charakter dyskusji z autorami artykułów zamieszczonych w kwartalniku.

I. Zasady obowiązujące przed skierowaniem artykułu do publikacji.

1. Autorzy

Autorem artykułu powinna być każda osoba, która wniosła intelektualny wkład w zakresie: tematu, treści i wniosków pracy lub uzyskała i interpretowała eksperymentalne dane przedstawione w artykule. Osoby wykonujące oznaczenia laboratoryjne bez interpretacji ich wyników, dostarczające próbki materiału do badań, szczepy mikroorganizmów, odczynniki, aparaturę badawczą a także osoby, które dokonały krytycznej oceny tekstu pracy mogą być wymienione w podziękowaniach.

Autorzy powinni wybrać spośród siebie jedną osobę odpowiedzialną za korespondencję z redakcją i upoważnić ją do reprezentowania ich we wszystkich sprawach związanych z publikacją. Autorzy artykułu powinni wyrazić zgodę na jego opublikowanie, co powinno być potwierdzone pisemnym oświadczeniem autora przesyłającego artykuł do redakcji czasopisma.

Autor zgłaszając artykuł do druku, powinien nadesłać pisemne oświadczenie, że praca nie została i nie zostanie złożona do druku w innym czasopiśmie przed opublikowaniem jej w kwartalniku „Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia”, oraz że wszyscy autorzy zapoznali się z regulaminem zamieszczania prac w kwartalniku i w pełni go akceptują. Autor zgłaszający artykuł do druku powinien podać swój dokładny adres do korespondencji wraz z numerem telefonu i adresem poczty elektronicznej.

W celu przeciwdziałania przypadkom „ghostwriting” i „guest authorship” Redakcja kwartalnika wprowadza następujące wymagania w stosunku do autora zgłaszającego manuskrypt:

- na autorze zgłaszającym artykuł spoczywa obowiązek ujawnienia wkładu poszczególnych autorów w powstanie publikacji z podaniem ich afiliacji oraz kontrybucji, tj. informacji kto jest autorem koncepcji, założeń, metod, protokołu itp. wykorzystywanych przy przygotowaniu publikacji.
- na autorze zgłaszającym artykuł spoczywa obowiązek ujawnienia informacji o źródłach finansowania publikacji, wkładzie instytucji naukowo – badawczych, stowarzyszeń i innych podmiotów,
- na autorze zgłaszającym artykuł spoczywa obowiązek złożenia w imieniu wszystkich autorów deklaracji o występowaniu lub nie występowaniu konfliktu interesów.

Formularz oświadczenia autora zgłaszającego artykuł znajduje się na stronie internetowej kwartalnika <http://www.medmikro.org.pl/>

Redakcja zobowiązana jest do ujawniania i dokumentowania wszelkich przejawów nierzetelności naukowej typu „ghostwriting” i „guest authorship”, włącznie z powiadomieniem odpowiednich podmiotów takich jak instytucje zatrudniające autorów, towarzystwa naukowe, stowarzyszenia edytorów czasopism naukowych itp.

W przypadku publikacji wyników badań przeprowadzonych na zwierzętach wymagane jest dołączenie oświadczenia, że na ich wykonanie uzyskano zgodę lokalnej komisji etycznej. W przypadku badań klinicznych wymagane jest oświadczenie, że badania zostały przeprowadzone zgodnie z zasadami Deklaracji Helsińskiej (www.wma.net).

Redakcja zastrzega sobie prawo do odmowy przyjęcia artykułu w przypadku braku powyżej wymaganych dokumentów.

2. Powtórna publikacja

Jest to publikacja zawierająca istotne elementy pracy już uprzednio opublikowanej. Czytelnicy czasopism medycznych mają prawo wierzyć, że publikowany artykuł jest pracą oryginalną. Jeżeli tak nie jest, artykuł powinien być poprzedzony wyraźnym oświadczeniem, że jest on powtórnie publikowany i powody takiej publikacji powinny być sprecyzowane. Należy również podać bibliograficzną pozycję pierwotnej publikacji.

II. Instrukcja dotycząca przygotowania artykułu.

Prace przeznaczone do druku powinny być nadsyłane do redakcji w 2 egzemplarzach wydruku komputerowego o formacie A4 z zachowaniem marginesu 4 cm z lewej strony i podwójnych odstępów pomiędzy wierszami (31 wierszy na stronie). Poszczególne strony powinny być numerowane.

Należy załączyć kopię artykułu na płycie CD Alternatywnie dopuszcza się przysyłanie kopii artykułu pocztą elektroniczną na adres e-mailowy redakcji: medmikrobiol@pzh.gov.pl. Autorzy powinni upewnić się, że tekst w formie elektronicznej jest identyczny z tekstem wydruku. Tekst pracy, tabele oraz ryciny należy przysyłać w osobnych plikach.

Pierwsza strona artykułu powinna zawierać kolejno: tytuł pracy w języku polskim, tytuł pracy w języku angielskim, pełne imię (imiona) i nazwisko autora (autorów) pracy, nazwę instytucji, w której wykonano pracę wraz z jej adresem (adresami). Słowa kluczowe w języku polskim i angielskim. Na kolejnych stronach należy umieścić tekst artykułu.

W tekście artykułu oryginalnego należy wyróżnić następujące części: Krótkie streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim, Wstęp, Materiał i metody, Wyniki, Dyskusja (lub Wyniki i ich omówienie), Wnioski (lub Podsumowanie), Piśmiennictwo, Udział poszczególnych autorów w powstaniu pracy i ewentualne Podziękowania. Poszczególne części artykułu mogą być wyróżnione podtytułami, o ile uczyni to tekst bardziej przejrzystym.

W tekście artykułu poglądowego należy wyróżnić jedynie następujące części: Krótkie streszczenie w języku polskim, Streszczenie w języku angielskim, Wprowadzenie, Właściwy tekst artykułu opatrzony podtytułami, Podsumowanie, Piśmiennictwo, Udział poszczególnych autorów w powstaniu pracy i ewentualne Podziękowania.

Krótkie komunikaty z prac doświadczalnych powinny zawierać główne części pracy oryginalnej.

Wszystkie słowa i nazwy łacińskie, nazwiska cytowanych autorów (zarówno w tekście jak i piśmiennictwie) oraz nazwiska autorów pracy należy pisać kursywą.

Krótkie streszczenie w języku polskim - umieszczone między tytułem a streszczeniem w języku angielskim, powinno wprowadzić czytelnika w treść pracy. Streszczenie to powinno być pisane pogrubioną czcionką i nie powinno przekraczać 6 wierszy maszynopisu.

Streszczenie (Abstract) - w języku angielskim powinno odzwierciedlać strukturę pracy, tj. zawierać następujące, wyszczególnione rozdziały:

- Introduction – z podaniem celu pracy,
- Methods – zawierające podstawowe metody i procedury,
- Results – główne obserwacje i wyniki
- Conclusion – krótkie podsumowanie lub najważniejsze wnioski.

Streszczenie nie powinno być dłuższe niż 500 słów oraz powinno być poprzedzone tytułem pracy oraz słowem „Abstract”

Wstęp - należy uzasadnić cel podjęcia badań i wyraźnie go sprecyzować. Cytowane we wstępie piśmiennictwo należy ograniczyć tylko do pozycji mających bezpośredni związek z treścią wstępu. We wstępie nie podaje się wyników ani wniosków z przeprowadzonych badań.

Material i metody – należy podać informacje dotyczące przedmiotu badań, zastosowanych metod i użytych odczynników w sposób na tyle wyczerpujący, aby umożliwić czytelnikowi powtórzenie doświadczenia lub obserwacji. Należy precyzyjnie opisać leki, szczepionki, odczynniki czy substancje stosowane w pracy. Dla powszechnie znanych metod należy podać pozycje piśmiennictwa, łącznie z metodami statystycznymi stosowanymi w pracy, dla metod już opublikowanych ale powszechnie nieznanymi, podać krótki opis z pozycjami piśmiennictwa, natomiast dla nowych lub istotnie zmodyfikowanych metod – podać ich pełny opis. Podtytuły należy pisać pogrubioną czcionką.

Wyniki – należy podać w logicznej sekwencji w tekście, tabelach i rycinach. Danych z tabel i rycin nie należy powtarzać w tekście. Należy ograniczyć się do podsumowania najważniejszych informacji.

Dyskusja – należy podkreślić nowe lub ważne aspekty wyników badań i omówić implikacje wypływające z ich przeprowadzenia oraz podać ich ograniczenia. Wyniki własnych badań powinny być ocenione na tle piśmiennictwa cytowanego przez autorów artykułu. Nie należy powtarzać szczegółowych danych przedstawionych w poprzednich częściach artykułu.

Wnioski – jeżeli autor uważa je za konieczne należy je sprecyzować w punktach lub podać krótko w formie opisowej. Powinny one łączyć się logicznie z celami pracy przedstawionymi we wstępie. Należy unikać stwierdzeń i wniosków nie wynikających z własnej obserwacji. Autorzy powinni wystrzegać się stwierdzeń na temat kosztów lub korzyści, jeżeli ich praca nie zawiera ekonomicznych danych i ich analizy. Jeżeli proponuje się hipotezę, należy jasno podać że jest to hipoteza. Należy unikać daleko idących wniosków z pracy, która nie została jeszcze zakończona. We wnioskach nie należy zamieszczać wyników pracy. Wnioski mogą być zastąpione krótkim Podsumowaniem, w którym autor może zwrócić uwagę na najważniejsze aspekty pracy.

Piśmiennictwo – należy pisać na osobnych stronach i ograniczyć tylko do pozycji cytowanych w tekście i mających bezpośredni związek z tematem pracy. W przypadku prac oryginalnych - nie więcej niż 25 pozycji, w przypadku prac poglądowych - 50 pozycji. Pozycje piśmiennictwa powinny być ułożone w porządku alfabetycznym wg nazwisk autorów. Przy cytowaniu prac w tekście należy podać w nawiasach tylko liczbę porządkową odnośnej publikacji w spisie piśmiennictwa. Należy również podać pozycje cytowane w tabelach lub w legendzie rycin, oraz unikać cytowania streszczeń i nie publikowanych prac i sprawozdań. Prace akceptowane do druku, ale jeszcze nie opublikowane powinny być oznaczone jako: „w druku”; autorzy powinni uzyskać pisemną zgodę na zacytowanie takiej pracy, jak też potwierdzenie, że cytowana praca została zaakceptowana do druku. Informacje pochodzące z manuskryptów przesłanych do redakcji, ale nie zaakceptowanych do druku powinny być jako „nieopublikowana praca” w tekście, a nie w wykazie piśmiennictwa, po uzyskaniu pisemnego pozwolenia od autora. Należy unikać cytowania „Informacja własna” lub „informacja osobista”, chyba że dane takie dostarczają istotnych informacji niedostępnych z publikowanych źródeł. W takich przypadkach nazwisko osoby i data uzyskania informacji powinny być cytowane w tekście.

W wykazie piśmiennictwa należy zachować następującą kolejność:

- a) nazwisko autora (-ów) i pierwsze litery ich imion,
- b) tytuł artykułu w pełnym brzmieniu,
- c) tytuł czasopisma w uznanym skrócie (według the List of Journal Indexed in Index Medicus);
- d) rok;
- e) tom;
- f) pierwsza i ostatnia strona artykułu.

Dla wydawnictw nieperiodycznych (np. książek) należy podać autora (autorów jak wyżej) tytuł rozdziału w pracach zbiorowych, tytuł książki, nazwisko jej redaktora, wydawcę, miejsce i rok wydania oraz strony od – do cytowanego rozdziału.

Przy większej liczbie autorów należy podać wszystkie nazwiska (do czterech autorów) lub nazwiska pierwszych trzech z dopiskiem „i inni”, gdy autorów jest więcej niż czterech.

Przykłady:

Artykuł z czasopisma medycznego:

1. *Schmitt-Grohe S, Cherry JD, Heiningen U* i inni. Pertussis in German adults. Clin Infect Dis 1995; 21: 860 – 6.
2. *Kostrzewski J*. Postępy wykorzystania poliomyelitis w świecie. Przegl Epidemiol 1994; 48: 355 – 60.
3. *Naruszewicz-Lesiak D, Wierzchowski N, Iwińska-Bukowicz B* i inni.. Podostre stwardniające zapalenie mózgu (SSPE) w Polsce w latach 1990-1993. V etap badań epidemiologicznych. Przegl Epidemiol 1995; 49: 261-6.

Książki i monografie

1. (Autorzy) *Juszczak J, Gładysz A*. Diagnostyka różnicowa chorób zakaźnych. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Wydanie II. Warszawa 1996.
2. (Organizacja jako autor) World Health Organization/ United Nations Children's Fund. State of the world's vaccines and immunization. WHO Geneva 1996.

3. (Rozdział w książce) *Krotochwil-Skrzypkowa M.* Odczyn i powikłania poszczepienne. W: *Szczepienia ochronne*. Red. *B. Dębiec, W. Magdzik*, PZWL, Warszawa 1991, 76 – 81.
4. (Doniesienie na konferencji). *Galęzka A.* Current trends of pertussis in developing and developed countries. Presented at the National Institutes of Health Pertussis Conference: Acellular Pertussis Vaccine Trials: Results and Impact on US Public Health. Washington, DC, June 3 – 5, 1966.

Tabele

Tabele należy pisać na oddzielnych stronach i ponumerować kolejno cyframi rzymskimi. Numeracja tabel powinna odpowiadać chronologii ich pojawiania się w tekście. Tabele powinny być zaopatrzone w tytuły (u góry). Każda kolumna tabeli powinna posiadać krótki nagłówek a szersze wyjaśnienia powinny być zamieszczone w odnośnikach pod tabelą a nie w nagłówku. W wyjaśnieniach należy wyraźnie opisać statystyczne miary zmienności takie jak standardowe odchylenie czy standardowy błąd średnich. Liczbę tabel należy ograniczyć tylko do istotnie niezbędnej dla dokumentacji uzyskanych wyników.

Ryciny

Ryciny i fotografie należy przygotować techniką komputerową i przesłać do redakcji plikach w postaci oddzielnych graficznych następujących formatów: TIF, BMP, JPG. Pod każdą ryciną należy umieścić podpis (np. Ryc. 1.....) z niezbędnymi objaśnieniami. Ryciny powinny być w kolorze czarno – białym.

W odpowiednim miejscu tekstu należy podać w nawiasach kolejne numery rycin lub tabel np. (Ryc.1) lub (Tab.1). Miejsca włączenia materiału ilustracyjnego powinny być zaznaczone ołówkiem na marginesie maszynopisu.

Objętość artykułów

Oryginalna praca naukowa nie może przekraczać 15 stron maszynopisu włączając tabele, ryciny, piśmiennictwo i streszczenie w języku angielskim. Prace pogładowe nie mogą przekraczać 20 stron maszynopisu. Krótkie komunikaty nie mogą przekraczać objętości 3 stron maszynopisu sporządzonego zgodnie ze wskazówkami podanymi dla prac oryginalnych. Listy do redakcji przeznaczone do opublikowania nie mogą przekraczać 2 stron maszynopisu i powinny być zaopatrzone imieniem i nazwiskiem autora oraz adresem miejsca pracy lub prywatnym.

Zasady ogólne

Redakcja zastrzega sobie prawo poprawienia usterek stylistycznych i nazewnictwa oraz dokonania koniecznych skrótów, bez porozumienia z autorem.

Redakcja nie zwraca artykułów nie przyjętych do druku. Za opublikowane artykuły autorzy nie otrzymują honorarium. Wydawca nabywa na zasadzie wyłączności ogół praw autorskich do wydrukowanych prac, w tym prawo do wydawania drukiem, na nośnikach elektronicznych, CD i innych oraz umieszczania ich w Internecie.

